

**Université de Montréal**

**Phosphorylation et régulation de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 par la  
protéine kinase RSK dans les mélanomes**

**Jérôme ROGER**

Programmes de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)  
en Biologie Moléculaire  
option générale

Août, 2015

© Jérôme ROGER, 2015

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Philippe ROUX de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche.

Je tiens également remercier Patrick Lacasse et Julie Moreau qui ont généré de nombreux résultats qui m'ont permis de continuer ce projet avec des bases solides.

Je tiens afin à remercier Antoine Méant, Justine Paradis, Alexandra Laverde-Saad et Viviane Calabrese pour leurs soutiens et pour leurs aides dans mes projets scientifiques.

## RÉSUMÉ

La voie de signalisation Ras/MAPK (Ras/mitogen-activated protein kinase) régule une variété de protéines intracellulaires qui jouent un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire. La régulation inappropriée de cette voie de signalisation conduit au développement de nombreux cancers comme le mélanome, qui est caractérisé par des mutations activatrices au niveau des gènes *NRAS* et *BRAF*. La protéine kinase RSK (p90 ribosomal S6 kinase) est un composant central de la voie Ras/MAPK, mais son rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire n'est pas bien compris. RSK a été montrée pour participer à la résistance des mélanomes aux chimiothérapies, mais le mécanisme moléculaire reste encore à élucider. Nous montrons à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique que MDM2 est phosphorylée en réponse à des agonistes et des mutations oncogéniques activant spécifiquement la voie Ras/MAPK. En utilisant des méthodes *in vitro* et *in vivo*, nous avons constaté que RSK phosphoryle directement MDM2 sur les Sérines 166 et 186, ce qui suggère que MDM2 est un substrat de RSK. La mutagenèse dirigée envers ces sites nous indique que ces résidus régulent l'ubiquitination de MDM2, suggérant que RSK régule la stabilité de MDM2 et de p53. De plus, nous avons observé que l'inhibition de RSK conduit à une augmentation du niveau protéique de p53 après un dommage à l'ADN dans les cellules de mélanomes. En conclusion, nos travaux suggèrent un rôle important de la protéine kinase RSK dans la régulation de MDM2 et de sa cible, p53. L'étude de ces mécanismes moléculaires aidera à mieux définir le rôle de RSK dans la croissance tumorale, mais également dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques.

**Mots-clés :** MAPK, mélanome, RSK, MDM2, p53, chimiorésistance

## ABSTRACT

The Ras/mitogen-activated protein kinase (Ras/MAPK) signaling cascade regulates various intracellular targets involved in growth and proliferation. Inappropriate regulation of this pathway leads to many types of cancer, including melanomas, which are characterized by activating mutations in *NRAS* and *BRAF*. The protein kinase RSK (p90 ribosomal S6 kinase) is a central component of the Ras/MAPK pathway, but its role in cell growth and proliferation is not well understood. RSK has also been shown to participate in the resistance of melanoma cells to chemotherapy, but the mechanisms involved remain elusive. We show that MDM2 becomes phosphorylated in response to agonists and oncogenes of the Ras/MAPK pathway. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we found that RSK directly phosphorylates MDM2 at Ser166 and Ser186, suggesting that MDM2 is a *bona fide* RSK substrate. Site-directed mutagenesis indicated that these residues regulate MDM2 ubiquitination, suggesting that RSK regulates p53 function in an MDM2-dependent manner. Overexpression of active and inactive mutants of RSK revealed that this kinase regulates p53 stability, suggesting a role for RSK in the DNA damage response. Taken together, our results suggest an important role for RSK in the regulation of MDM2 and its target p53. In view of the role of p53 in the response to DNA-damaging agents, our results provide a potential mechanism involved in melanoma chemoresistance.

**Keywords :** MAPK, melanoma, RSK, MDM2, p53, chemoresistance



## Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>.....</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>..... i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>..... ii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>..... vi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>..... vii</b>
<b>Chapitre 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>..... 1</b>
<b>I. Physiologie de la peau .....</b>	<b>..... 1</b>
A. L'épiderme .....	1
B. Le derme .....	2
C. L'hypoderme .....	2
<b>II. Le mélanocyte .....</b>	<b>..... 2</b>
A. L'origine du mélanocyte .....	2
B. Localisation et rôle fonctionnel du mélanocyte .....	3
<b>III. Le mélanome cutané .....</b>	<b>..... 4</b>
A. Les facteurs de risque du mélanome .....	4
B. Les mutations et voies de signalisation associées à la transformation des mélanocytes .....	5
C. Les étapes du développement mélanocytaire .....	6
1. Le naevus commun .....	6
2. Naevus dysplasique .....	9
3. Phase de croissance radiale : RGP (Radial Growth Phase) .....	10
4. Phase de croissance verticale : VGP (Vertical Growth Phase) .....	11
5. Cellules circulantes et métastases .....	11
<b>IV. Thérapies et résistance des mélanomes .....</b>	<b>..... 12</b>
<b>V. La voie de signalisation Ras/MAPK .....</b>	<b>..... 13</b>

A. Les acteurs de la voie Ras/MAPK .....	14
B. Activation de la petite GTPase Ras .....	15
C. Les protéines kinases Raf/MEK/ERK.....	16
D. La famille des kinases RSK .....	18
<b>VI. MDM2 : une E3 ubiquitine ligase .....</b>	<b>19</b>
A. Dégradation protéique par l'E3 ubiquitine ligase.....	20
B. Structure et modification post-traductionnelle de MDM2.....	21
C. Relation entre p53 et MDM2 .....	24
<b>Chapitre 2 : MISE EN CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE MAITRISE.....</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre 3 : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre 4: RÉSULTATS.....</b>	<b>31</b>
I. L'activation de la voie de signalisation MAPK induit la phosphorylation de MDM2.....	31
II. La phosphorylation de MDM2 par la voie MAPK est dépendante de MEK et RSK .....	34
III. MDM2 est un substrat direct de RSK .....	37
IV. RSK favorise l'accumulation protéique de MDM2 .....	40
V. La phosphorylation de MDM2 sur les Ser166/186 régule l'ubiquitination et la stabilité de la protéine .....	45
VI. Les mutations oncogéniques de la voie MAPK induisent une phosphorylation constitutive de MDM2. ....	48
VII. MDM2 est constitutivement phosphorylée dans les mélanomes présentant une mutation oncogénique dans la voie MAPK .....	49
VIII. L'inhibition de RSK augmente le niveau protéique de p53 suite à un dommage à l'ADN dans les mélanomes. ....	51
IX. Le niveau protéique de p53 dans les mélanomes est dépendant de MDM2 et du protéasome..	53
<b>Chapitre 5: DISCUSSION .....</b>	<b>55</b>
I. Caractérisation de la phosphorylation de MDM2 par la kinase RSK .....	55
II. Caractérisation du rôle fonctionnel de la phosphorylation de MDM2 par RSK.....	57

III. Evaluation du rôle de RSK dans la réponse au dommage à l'ADN et la chimiorésistance des mélanomes .....	58
<b>Chapitre 6: CONCLUSION .....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>62</b>

## Liste des figures

Figure 1 Modélisation de la progression du mélanome .....	6
Figure 2 Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome.....	8
Figure 3 La voie de signalisation Ras/MAPK .....	17
Figure 4 Structure et régulation post-traductionnelle de MDM2.....	24
Figure 5 Boucle d'autorégulation entre MDM2 et p53 .....	26
Figure 6 La voie MAPK induit une phosphorylation de MDM2 en Ser166 .....	33
Figure 7 La phosphorylation de MDM2 en Ser166 est dépendante de MEK1/2.....	35
Figure 8 La phosphorylation de MDM2 est corrélée avec le niveau d'activité de RSK.....	37
Figure 9 Présence d'un complexe entre la kinase RSK et MDM2 .....	38
Figure 10 MDM2 est un substrat direct de RSK.....	40
Figure 11 Le niveau protéique de MDM2 est dépendant de l'activité de RSK .....	42
Figure 12 RSK régule la quantité protéique de MDM2.....	44
Figure 13 RSK semble agir positivement sur la stabilité de MDM2.....	46
Figure 14 Les Ser166 et 186 agissent sur le poly-ubiquitination de MDM2.....	48
Figure 15 Les mutations oncogéniques de la voie MAPK favorisent la phosphorylation de MDM2 .....	49
Figure 16 Les mélanomes montrent une phosphorylation constitutive de MDM2 en Ser166 .	50
Figure 17 Les inhibiteurs de RSK semblent augmenter le niveau protéique de p53 lors d'un dommage à l'ADN .....	52
Figure 18 La régulation de p53 dans les mélanomes est dépendante du protéasome et de MDM2 .....	54

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxiriboNucléique

AGC: protéine kinase A, G and C

Akt/PKB: protéine kinase B

AMPK: AMP-activated protéine kinase

ARF: Alternate Reading Frame

ARN: Acide Ribonucléique

ATP: Adenosine Triphosphate

BAD: Bcl2 Antagonist for the cell Death

c-KIT/SCFR: Mast/stem cell growth factor receptor

CAMK: Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase

CCDN1 : Cycline D1

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

CDKN2A/p16/ p16INK4a: Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A

CTKD: Carboxy-Terminal Kinase Domain

DAPK: Death-Associated Protein Kinase

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

E1: Enzyme activatrice E1

E2: Enzyme conjugante E2

E2-Ub: Complexe E2 et ubiquitine

E3 ligase: Ubiquitine ligase

ECL: chimioluminescence

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FBS: fetal bovine serum

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

GAP: GTPase-Activating Proteins

GDP: Guanosine Diphosphate

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

Grb2: Growth factor Receptor Bound protein 2  
 GTP: Guanosine Tri-Phosphate  
 HER: Human Epidermal growth factor Receptor  
 HGF: Hepatocyte Growth Factor  
 HMG : High Mobility Group  
 RSK1: p90 ribosomal s6 kinase  
 IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor  
 IRS1: Insulin Receptor Substrate 1  
 JNK1/2/3: c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3  
 KIM: kinase-interacting motif  
 KSR: Kinase Suppressor of Ras  
 MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
 MAPKKK: MAPK Kinase Kinase  
 MARK: MAP-regulating kinase/microtubule affinity-regulating kinase  
 MDM2: Mouse double minute 2  
 MEC: matrice extracellulaire  
 MEK: Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase  
 MITF: Microphthalmia associated transcription factor  
 mTOR: mammalian target of rapamycin  
 NES : séquence d'export nucléaire  
 NF-kB: Nuclear Factor Kappa B  
 NGF: Nerve Growth Factor  
 NLS: Signal de Localisation Nucléaires  
 NoLS: séquence de localisation nucleolaire  
 NTKD: amino- Terminal Kinase Domain  
 PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
 PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor  
 PDK1 3'- phosphoinositide-dependent protein kinase 1  
 PH: Pleckstrin Homology  
 PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase  
 PIP2: Phosphatidylinositol-(4-5)-biPhosphate  
 PIP3: Phosphatidylinositol-(3-4-5)-triPhosphate  
 S6K: S6 Kinase

PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
PVDF: polyvinylidene difluoride  
Raf : Rapidly accelerated fibrosarcoma  
Ras: Rat sarcoma  
Rb: Retinoblastoma protein  
RBD: Ras Binding Domain  
RCPG: récepteur couplé aux protéines G  
RGP: Radial Growth Phase  
RING-finger: Really INteresting Gene  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium  
RSK: p90 Ribosomal S6 Kinase  
RTK: récepteurs tyrosine-kinase  
S6: 40S ribosomal protein S6  
SCF: Stem Cell Factor  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SFA: substance fondamentale amorphe  
SH2: Src Homology 2  
shRNA: small hairpin RNA  
SOX10: SRY-related HMG-box  
SOS: Son Of Sevenless  
TBST: Tris-Buffered Saline and Tween 20  
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta  
Tp53: Tumor Protein 53  
TUBE: Tandem Ubiquitin Binding Entite  
Ub: ubiquitine  
UBA: ubiquitin-associated domains  
UPS: Ubiquitin Proteasome System  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VGP: Vertical Growth Phase

# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## I. Physiologie de la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain (deux m<sup>2</sup> de surface pour un adulte de taille moyenne) et forme une barrière physique souple. Située à l'extrémité de l'organisme, elle protège les tissus et les organes des agressions extrinsèques telles que des infections, des agents chimiques, des chocs physiques, et des rayonnements nocifs, en particulier les ultraviolets. De plus, la peau est dotée de structures nerveuses qui lui permettent de distinguer des différences de pression, de température et de percevoir la douleur. Cet organe multifonctionnel est constitué d'une variété de types cellulaires qui interagissent entre eux garantissant sa structure et ses fonctions. La peau est principalement composée de trois couches superposées: l'épiderme (couche externe), le derme et l'hypoderme.

### A. L'épiderme

Cet épithélium mince est formé de cinq couches kératinisées (couche cornée (couche supérieure), couche claire, couche granuleuse, couche épineuse, et couche basale). Il est composé à plus de 80% de kératinocytes. Ces kératinocytes migrent de la couche basale, assise germinative contenant environ 10% de cellules souches kératinocytaires, vers la couche cornée. La maturation des cellules dans les couches supérieures est appelée kératinisation (Smack et al., 1994). L'épiderme est constitué également de 2 à 4% de cellules de Langerhans, ayant un rôle immunitaire dans l'épiderme (Lappin et al., 1996). Les cellules de Merkel, jouant un rôle de mécanorécepteur, sont également présentes dans la couche basale de manière irrégulière (Mahrle and Orfanos, 1974). Enfin, les mélanocytes, responsables de la pigmentation de la peau, constituent le dernier type cellulaire existant dans l'épiderme. Tandis que les follicules pileux, les poils, les glandes sébacées et sudorales sont définis comme des annexes épidermiques.



## B. Le derme

Ce tissu conjonctif richement vascularisé et innervé est composé d'une abondante MEC (matrice extracellulaire) synthétisée et remodelée en permanence par des fibroblastes (Prost-Squarcioni et al., 2008). Ces fibroblastes jouent un rôle important dans le système immunitaire par l'intermédiaire des macrophages et des mastocytes. La MEC est constituée de fibres élastiques et de fibres de collagène encerclées par la SFA (substance fondamentale amorphe). Les fibres élastiques sont principalement composées de fibrilline-1. Les fibres de collagène sont essentiellement constituées de collagène I, III et V (van der Rest and Garrone, 1991). Enfin, la SFA provenant des fibroblastes est un assemblage de glycosaminoglycanes sulfatés et d'acide hyaluronique, qui s'associent pour former des protéoglycanes. Par l'intermédiaire de la SFA, la matrice extracellulaire garantit l'hydratation de la peau et son élasticité.

## C. L'hypoderme

Tout comme le derme, c'est un tissu conjonctif, richement vascularisé, constitué essentiellement de tissus graisseux formés d'adipocytes organisés dans une structure en lobe. Ces lobes sont isolés par du tissu conjonctif qui se compose de fibroblastes et de macrophages. L'hypoderme sert d'isolant thermique et de stockage énergétique.

# II. Le mélanocyte

## A. L'origine du mélanocyte

Une étude montre que les mélanocytes proviennent de la crête neurale (Rawles, 1947). La crête neurale est constituée d'une population cellulaire multipotente à l'origine de nombreux types cellulaires comme les neurones, les cellules musculaires lisses et les mélanoblastes progéniteurs des mélanocytes. Les cellules de la crête neurale migrent durant l'embryogénèse (Teillet and Le Douarin, 1970). Les mélanoblastes vont migrer de manière dorsolatérale entre les somites et l'ectoderme.

Pendant cette migration, les mélanoblastes vont se différencier en mélanocytes. De plus, il a été récemment montré qu'une grande partie des mélanocytes proviennent également des précurseurs de cellules de Schwann (Adameyko et al., 2009; Adameyko et al., 2012). La différenciation des mélanoblastes est due au facteur de transcription SOX10 (SRY-related HMG-box) provenant de la famille HMG (High Mobility Group) (Mollaaghababa and Pavan, 2003). Il a été montré qu'une partie des mélanocytes reste indifférenciée dans le renflement du poil. Ces cellules sont maintenues en état de quiescence par le TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) sécrété par les kératinocytes (Nishimura et al., 2010). Des modèles de peaux reconstruites ont permis de mettre en évidence la présence de cellules souches dermiques pluripotentes dans le derme humain, capables de migrer dans l'épiderme et de se différencier en mélanocytes (Li et al., 2010). En résumé, les mélanocytes sont des cellules originaires de la crête neurale qui vont en partie se différencier lors du développement embryonnaire tandis que le reste des cellules est maintenu à l'état de cellules souches afin de favoriser la régénération des mélanocytes chez l'adulte.

## **B. Localisation et rôle fonctionnel du mélanocyte**

Les mélanocytes matures sont localisés au niveau de la jonction dermo-épidermique de la peau, de la matrice du bulbe pileux, de différentes structures de l'œil, des muqueuses, du cœur et de l'oreille interne. Les mélanocytes représentent 2% à 10% des cellules épidermiques. Le principal rôle physiologique des mélanocytes est la synthèse de la mélanine. Cette synthèse est effectuée au sein d'organites cellulaires, apparentés à des vésicules lysosomales, appelées mélanosomes. La maturation progressive des mélanosomes favorise la synthèse de pigments mélaniques (Marks and Seabra, 2001; Raposo and Marks, 2002).

### III. Le mélanome cutané

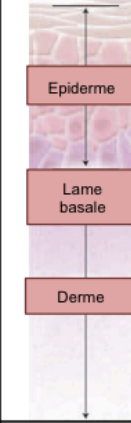
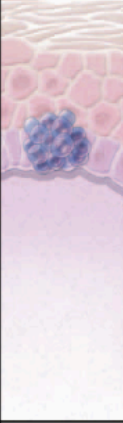
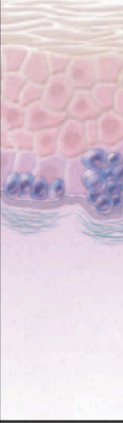
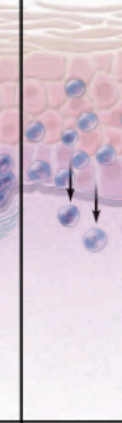
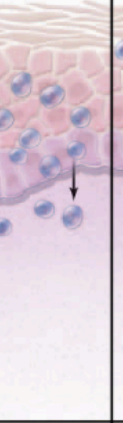
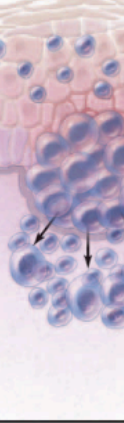
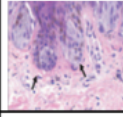
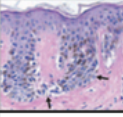
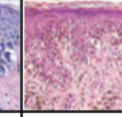
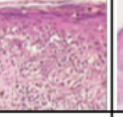
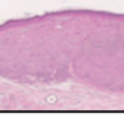
#### A. Les facteurs de risque du mélanome

Chaque année, 140 000 nouveaux cas de mélanomes sont constatés dans le monde. Dans ses premiers stades de progression, le mélanome malin peut être traité par intervention chirurgicale (Breslow, 1978). Cependant, dès qu'il progresse jusqu'au stade métastatique, ce cancer devient très agressif et résistant aux chimiothérapies conventionnelles. Il représente seulement 4% des cancers dermatologiques, pourtant le mélanome est responsable de 80% des décès parmi les cancers cutanés (Miller and Mihm, 2006). Contrairement à la plupart des cancers, le mélanome est fréquent chez les jeunes adultes (15-45 ans) mais rare dans la population pédiatrique (Lange et al., 2007). Comme dans la plupart des cancers, les facteurs génétiques et environnementaux sont les principaux facteurs de risque. La proportion des mélanomes de type héréditaire est estimée à 8-12% (Fountain et al., 1990). La présence de grains de beauté (naevi) est un facteur de risque important du développement du mélanome lorsqu'ils sont sur-représentés sur l'ensemble du corps (Gandini et al., 2005a; Gandini et al., 2005c). Le facteur environnemental le plus important est l'exposition aux rayonnements UVs. Cette exposition cause des mutations génétiques au sein des mélanocytes, responsables du développement du mélanome (Gandini et al., 2005b; Thompson et al., 2005).

Le mélanome est un cancer présentant différentes formes anatomo-cliniques. Le mélanome à extension superficielle est le plus courant (70% des cas), il correspond à un changement d'apparence du naevus. Le mélanome nodulaire (10% à 15% des cas) est une tumeur infiltrante et peut être achromique. Le mélanome lentigo ou de Dubreuilh (5% des cas) est plus souvent rencontré chez le sujet âgé et présente un bon pronostic. Enfin le mélanome des extrémités ou mélanome acral (2% à 10% des cas) touche la plante des pieds et la paume des mains.

## B. Les mutations et voies de signalisation associées à la transformation des mélanocytes

En clinique, la classification des mélanomes s'effectue en fonction de différents critères tels que : l'épaisseur totale, la prolifération, la présence d'ulcération, la profondeur de pénétration et la localisation des métastases existantes. Histologiquement, on peut distinguer cinq étapes de progression du mélanome (figure 1). L'indice de Clark qui est très utilisé permet de distinguer ces 5 degrés d'invasion : le mélanome intra-épidermique (Clark I), l'infiltration de quelques cellules mélanocytaires dans le derme (Clark II), l'infiltration de tout le derme papillaire (Clark III), l'invasion du derme réticulaire (Clark IV) et enfin l'occupation de l'hypoderme (Clark V) (Clark et al., 1991). D'autres modes de classification sont utilisés comme la classification de Breslow qui mesure l'épaisseur tumorale d'un mélanome. Cette mesure prend comme point de départ la couche épidermique granuleuse et va jusqu'à la cellule tumorale la plus profonde (Breslow, 1980). Une troisième classification récente prend en considération quatre critères : l'épaisseur et l'ulcération de la tumeur ; la localisation des métastases ; le nombre de ganglions lymphatiques touchés et le taux de lactate-déshydrogénases circulantes (Balch et al., 2001). Cependant, les mécanismes de transformation du mélanome ne sont pas encore bien compris malgré la connaissance des mutations favorisant la survie et la croissance des cellules de mélanome. Nous allons donc décrire les différentes étapes du développement mélanocytaire : l'apparition de naevi, leurs migrations en phase radiale, puis longitudinale et la dissémination des cellules de mélanome à travers l'organisme.

Progression tumorale →					
Stade	Naevus bénin	Naevus dysplasique	Phase de croissance radiale	Phase de croissance verticale	Mélanome métastatique
					
Marquage H&E/S100					
Processus biologique	Mutation activatrice, sénescence	Perte d'un gène suppresseur de tumeur, Sénescence répllicative	Immortalisation, Augmentation de la sénescence, Accroissement des capacités prolifératives	Perte de la dépendance aux kératinocytes, transition épithélio-mésenchymateuse, Traversée de la lame basale	Augmentation des propriétés invasives, Dissociation de la tumeur primaire, Survie dans la circulation générale, Prolifération dans de nouveaux tissus
Altérations géniques	Mutation de BRAF ou NRAS	Perte de CDKN2A et/ou PTEN	Surexpression de la cycline D1 de TBX2, Mutations éventuelles de c-Kit ou CDK4, Expression de la télomérase	Secrétion autocrine de facteurs de croissance, Inactivation de la voie p53, Activation des voies c-Met, Slug, Snail, TGF-β, Wnt/β-caténine, Perte de la E-cadhérine au profit de la N-cadhérine, Expression de MMP-2 et MMP-9	

Adapté de Miller et al, 2006

Reproduced with permission from (Miller and Mihm, 2006), Copyright Massachusetts Medical Society.

**Figure 1 Modélisation de la progression du mélanome**

Les cellules de mélanome sont représentées en bleu. Le schéma représente l'aspect histologique associé à chaque stade du développement mélanocytaire. Le tableau décrit les processus biologiques et les altérations géniques favorisant la progression du mélanome.

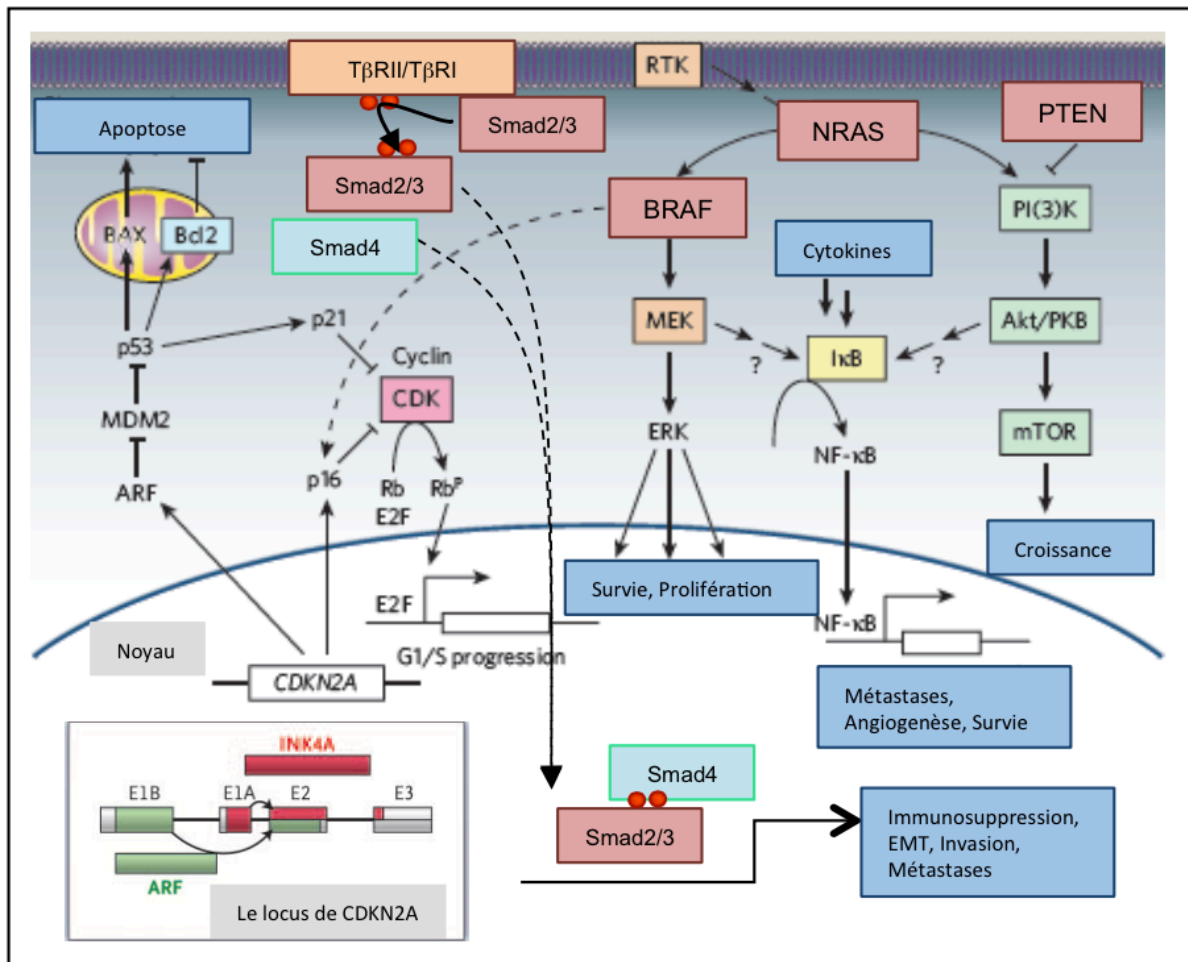
## C. Les étapes du développement mélanocytaire

### 1. Le naevus commun

Le naevus commun est familièrement appelé « grain de beauté ». Il s'agit d'une excroissance cutanée bénigne, résultant d'une prolifération anormale et anarchique des mélanocytes, qui s'accumulent en

amas dans l'épiderme et/ou le derme. Au niveau moléculaire, les naevi se caractérisent par une activation constitutive de la voie ERK/MAPK (Extracellular signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase) (figure 1), rencontrée dans 90% des cas de mélanome (Oba et al., 2011; Zhuang et al., 2005). Les mécanismes responsables de l'activation de ERK sont dus aux mutations activatrices de l'oncogène *NRAS*, ces mutations sont retrouvées dans 15-30% des mélanomes (van Elsas et al., 1995). *NRAS* fait partie de la famille des gènes Ras (Rat sarcoma) qui se compose également de *HRAS* et *KRAS*. La mutation de la protéine N-Ras principalement rencontrée est la substitution de la glutamine par une leucine en position 61, N-RAS<sup>Q61L</sup>. Cependant, la mutation au sein de B-RAF est le facteur majoritairement responsable de l'activation de la voie ERK, celui-ci est muté dans plus de 80% des naevi, 66% des mélanomes primaires et 60% des mélanomes métastatiques (Davies et al., 2002; Kumar et al., 2003). *BRAF* est l'un des trois gènes de la famille *RAF* composée également de *ARAF* et *CRAF*. Plus de 90% des mutations B-RAF ont pour origine une substitution de la valine par un acide glutamique B-RAF<sup>V600E</sup>. Cette mutation mime la phosphorylation aux positions T598 et S601 ayant pour effet d'engendrer une activation constitutive de B-RAF (Davies et al., 2002). B-RAF<sup>V600E</sup> active ainsi la voie ERK, qui joue un rôle dans la phase radiale de croissance, la prolifération, la survie. L'activation de cette voie de signalisation apporte à la tumeur les conditions nécessaires à son maintien et à sa croissance lors de la progression du mélanome (Gray-Schopfer et al., 2005). B-RAF<sup>V600E</sup> participe également à la néo-angiogénèse en incitant la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Sharma et al., 2005). Ainsi, l'activation constitutive de la voie RAS/MAPK constitue un évènement primordial dans la transformation du mélanocyte. Cependant, la majorité des naevi sont des tumeurs bénignes, dues à un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire causé par le phénomène de sénescence induit par ces oncogènes (Dhomen et al., 2009; Michaloglou et al., 2005; Pollock et al., 2003). Dans des naevi présentant une mutation B-RAF<sup>V600E</sup>, il a été montré, *in vivo* et *in situ*, une induction de p16<sup>INK4a</sup>, une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase,

caractéristique de la sénescence, sans perte apparente des télomères. Cette étude suggère un rôle protecteur de l'oncogène BRAF dans l'induction de la sénescence. En effet, BRAF participe au maintien du potentiel réplcatif ; la sénescence est donc incomplète. Les naevi peuvent donc rester stables durant des décennies et se libérer de ces contraintes prolifératives en acquérant de nouvelles lésions moléculaires et ainsi deviennent des tumeurs malines (Michaloglou et al., 2005)



Reproduced with permission from (Gray-Schopfer et al., 2005; Miller and Mihm, 2006), Copyright Massachusetts Medical Society and Nature publishing group.

**Figure 2 Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome**

La voie RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK/ERK Kinase), activée via des RTK, joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires. La voie PI3K/AKT inhibée par la protéine PTEN régule de nombreux facteurs favorisant la prolifération cellulaire, la survie et le développement métastatique. La voie du TGF-β possède des effets antiprolifératifs lors des premières étapes du développement mélanocytaire, puis devient pro-tumorale. Celle-ci participe aux phénomènes d'EMT, métastatique et

d'invasion. Le gène *CDKN2A* qui code pour deux protéines, p16 et ARF, est inactivé dans le mélanome favorisant la prolifération cellulaire induite par les cyclines CDK (CDK4/6) et la résistance à l'apoptose via la protéine MDM2. (Adapté de Gray-Schopfer, et al 2007, Miller A, 2006)

## **2. Naevus dysplasique**

Le naevus dysplasique se caractérise par une forme asymétrique et une absence d'homogénéité cytologique due à de nouvelles lésions ou à une évolution du naevus commun. D'un point de vue moléculaire, le naevus dysplasique montre une inactivation de *CDKN2A* dans le cas des mélanomes familiaux (25 à 40%) (Thompson et al., 2005) et/ou une inactivation de *PTEN* dans le cas des mélanomes non familiaux (25 à 50%) (Miller and Mihm, 2006).

*CDKN2A* est un gène suppresseur de tumeur qui code pour deux transcrits, résultant de l'épissage alternatif (Quelle et al., 1995), p16<sup>INK4</sup> et p14<sup>ARF</sup> (Figure 2). La protéine p16<sup>INK4a</sup> bloque le cycle cellulaire en phase G1/S. Elle inhibe l'activité kinase du complexe cycline D1/CDK4 et CDK6, qui ont pour rôle d'inactiver la protéine suppresseur de tumeur Rb (retinoblastoma), afin de favoriser la progression du cycle cellulaire (Serrano et al., 1993). Tandis que la protéine p14<sup>ARF</sup> stabilise la protéine « gardienne du génome » p53. Pour cela p14<sup>ARF</sup> inhibe l'activité de la protéine MDM2 qui joue un rôle important dans la dégradation de p53 (Zhang et al., 1998). L'action de p14<sup>ARF</sup> va ainsi favoriser l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose par l'intermédiaire de p53 (Zhang et al., 1998). Une absence de la protéine p14<sup>ARF</sup> abolit la sénescence induite par les oncogènes et augmente les risques de transformation tumorale (Sharpless et al., 2004). Il est important de noter que le gène *TP53*, qui code pour la protéine p53 est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (Green and Kroemer, 2009; Levine et al., 1991), et est très rarement muté dans les mélanomes (10%) comparativement à d'autres cancers (Poremba et al., 1995). La perte de p14<sup>ARF</sup> va induire une augmentation de l'activité de MDM2 ayant pour effet d'inactiver la voie p53 (Sharpless et al., 2003;



Sharpless et al., 2004). Les mutations oncogéniques de *BRAF* et *NRAS* et la perte d'expression de *CDKN2A* sont deux facteurs essentiels à la transformation des mélanocytes en mélanomes.

Dans le cas des mélanomes non familiaux c'est la protéine PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) qui est inactive. PTEN fait partie de la voie PI3K, une autre voie de signalisation, qui induit la progression du mélanome.

PTEN code pour une phosphatase de lipide qui déphosphoryle le PIP3 (Phosphatidylinositol-(3-4-5)-triPhosphate) en PIP2 (Phosphatidylinositol-(4-5)-biPhosphate) ayant pour effet de diminuer l'activité de AKT en limitant son recrutement à la membrane plasmique (Cantley, 2002). Les phosphoinositides sont des lipides membranaires qui agissent comme des messagers secondaires afin d'activer de nombreuses voies de signalisation dont Akt (Cully et al., 2006). Akt régule de nombreux facteurs jouant un rôle dans la prolifération cellulaire et la survie comme BAD (Bcl2-associated agonist of cell death) (Dillon and Muller, 2010), Caspase-9 ou encore NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) (Soengas and Lowe, 2003). Une diminution de PTEN ayant pour effet d'augmenter l'activité d'Akt favorise la survie et la prolifération cellulaire. Dans les mélanomes, il a été montré que l'activation sélective de Akt3 est présente dans 40 à 60% des mélanomes, résultante d'une surexpression de AKT3, due à une amplification génique, et d'une perte de PTEN (Shao and Aplin, 2010; Stahl et al., 2004). Il a été montré que son inhibition réduit la survie des cellules de mélanome (Stahl et al., 2004). L'activation d'Akt3 et la perte de PTEN assorties à une mutation B-RAF<sup>V600E</sup> ou à la perte de *CDKN2A* contribuent à la transformation maligne du mélanome (Cheung et al., 2008; Dankort et al., 2009; You et al., 2002).

### **3. Phase de croissance radiale : RGP (Radial Growth Phase)**

En phase de croissance radiale, les mélanomes sont situés à la jonction dermo-épidermique, où ils constituent de petits amas étendus. Les cellules mélanocytaires prolifèrent selon l'orientation épidermique et sont immortalisées par un contournement du processus de sénescence. Cette

prolifération est liée à une augmentation de la cycline D1 (Miller and Mihm, 2006). Lors de la phase de croissance radiale, les cellules mélanocytaires sont dépendantes des facteurs de croissance produits par les kératinocytes. La cycline D1 est un proto-oncogène qui joue un rôle important dans le développement de certains cancers, car c'est une sous-unité activatrice des kinases CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase) et CDK6. Le profil d'expression de la cycline D1 est accentué dans près de 20% des cas de mélanomes.

L'inhibition de cette protéine dans les mélanomes induit l'apoptose et la diminution de la croissance tumorale, et démontre ainsi le potentiel oncogénique de cette protéine (Sauter et al., 2002).

Enfin, dans les mélanomes la voie ERK peut également être constitutivement activée par la production autocrine de facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), le SCF (Stem Cell Factor), ou le HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Lazar-Molnar et al., 2000; Satyamoorthy et al., 2003).

#### **4. Phase de croissance verticale : VGP (Vertical Growth Phase)**

L'avancée du mélanome vers la phase de croissance verticale est critique dans la progression tumorale. Les cellules vont pénétrer en profondeur dans le derme en proliférant activement de manière verticale. Au niveau de la couche basale, des nodules expansifs apparaissent. Les cellules de mélanome en VGP sont immortelles et possèdent un fort pouvoir métastatique. Cette transition est causée par une accumulation d'anomalies génétiques ayant pour effet la perte des jonctions cellulaires. L'expression des E-cadhérines est diminuée dans les cellules en VGP tandis que, l'expression des N-cadhérines est augmentée. Ces observations sont caractéristiques d'une EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) (Thiery et al., 2009). Lors du passage à l'EMT, les cellules acquièrent des propriétés migratoires et invasives (Thiery and Sleeman, 2006). Ces cellules sont résistantes à l'apoptose grâce à l'inactivation de p53 et/ou PTEN, dont les mécanismes ont été expliqués précédemment.

#### **5. Cellules circulantes et métastases**

L'étape finale de progression du mélanome est la propagation métastatique des cellules cancéreuses dans l'organisme via la circulation sanguine. Ainsi, les tumeurs distantes de la tumeur primaire vont se situer principalement dans les poumons, les ganglions lymphatiques, le cerveau et le foie. L'utilisation de différents biomarqueurs spécifiques de ces cellules permettent de définir une thérapie plus ciblée afin de diminuer la progression du mélanome chez le patient (Koyanagi et al., 2010; Sakaizawa et al., 2012).

#### IV. Thérapies et résistance des mélanomes

Une intervention chirurgicale permet une rémission de 97% des mélanomes (Balch et al., 2003). Alors que, les traitements par chimiothérapie, radiothérapie ou immunothérapie des mélanomes métastatiques sont encore peu efficaces (Atallah and Flaherty, 2005). Il est à noter que les cellules de mélanome entrent moins en apoptose *in vivo* par rapport à d'autres types de cellules cancéreuses et sont très résistantes aux drogues induisant l'apoptose *in vitro* (Soengas and Lowe, 2003). La dacarbazine, un agent alkylant, a longtemps été utilisée en chimiothérapie de référence. Seuls 10% des patients y répondent. Ce faible taux de réponse est retrouvé avec d'autres molécules comme la carmustine, le paclitaxel, le témolozomide ou les analogues du cisplatine (Tarhini and Agarwala, 2006). Une molécule comme le sorafénib, un inhibiteur multi-kinases permet de cibler la voie des oncogènes, c-KIT, BRAF, NRAS. Depuis quelques années, les industries pharmaceutiques développent des thérapies ciblées permettant de mieux traiter les mélanomes suivant leurs altérations génétiques (Hocker et al., 2008; Smalley and Herlyn, 2009). Les mélanomes présentant la mutation B-RAF<sup>V600E</sup> sont traités par exemple avec la molécule appelée vemurafenib (PLX4032). On constate cependant l'apparition rapide de mécanismes de résistance, comme la mutation N-RAS dans la tumeur de mutation B-RAF<sup>V600E</sup> (Nazarian et al., 2010). De plus, lors d'une biopsie de patient traité au PLX4032, dont le mélanome progressait de nouveau, PTEN a été retrouvée délétée (Villanueva et al., 2010). L'activation de la voie PI3K permet de contourner l'effet de l'inhibition de B-RAF. De nouvelles thérapies ciblant les voies

oncogéniques dépendant de c-KIT, N-RAS, MITF, CDK4 ou p53 sont actuellement en développement clinique (Flaherty and Fisher, 2011). L'hétérogénéité des altérations géniques, retrouvées chez des patients atteints du mélanome, induit divers mécanismes de résistance et une inefficacité des thérapies conventionnelles.

Depuis 2011, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé sept nouveaux agents thérapeutiques prometteurs tels que les inhibiteurs de BRAF (vemurafenib 2011, dabrafenib 2013) l'inhibiteur de MEK (trametinib 2013), les anticorps anti-PD1 (nivolumab 2014, pembrolizumab 2014), les anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab 2011), ou le peginterféron-alfa-2b (2011) destiné à être utilisé dans les cas les plus avancés de mélanome. Néanmoins, les chercheurs continuent de travailler sur de nouvelles méthodes de traitement permettant de contrer la progression du mélanome et les cas de chimiorésistances.(Niezgoda et al., 2015)

Il est évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires favorisant la progression du mélanome aidera à trouver une thérapie efficace et personnalisée (Riker et al., 2007).

## V. La voie de signalisation Ras/MAPK

La voie des MAPK est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la migration cellulaire, la mitose, l'angiogénèse, la survie cellulaire et l'apoptose. Cette voie de signalisation activée via des récepteurs membranaires, tel que EGFR, demeure très conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes (Widmann et al., 1999). Ses récepteurs sont activés par l'intermédiaire de ligands qui sont des facteurs de croissance. Chez les mammifères, les MAPKs conventionnelles sont composées de 4 groupes: ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), JNK1/2/3 (c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3), p38 isoformes et ERK5 (Cargnello and Roux, 2011). Les modules de MAPKs conventionnels se composent de trois kinases hautement conservées durant l'évolution qui s'activent de manière séquentielle. Après stimulation par des facteurs de croissance, les récepteurs membranaires

à activité tyrosine kinase (RTK) vont induire une activation en cascade de la voie Ras/MAPK. Ils vont activer la MAPKKK (MAPK Kinase Kinase) qui va activer par phosphorylation la MAPKK qui par la suite phosphoryle la MAPK. La MAPK ainsi activée va intervenir dans différents processus biologiques en activant par phosphorylation différents substrats. La MAPK va activer directement la famille des kinases activées par les MAPK (MAPKAPK) représenté par les kinases RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase), MSK (Mitogen- and Stress-activated kinases), MNK (MAPK-interacting kinases), MK2/3 (MAPK activated protein kinase 2/3) et MK5 (Cargnello and Roux, 2011). Ceci permettra d'amplifier le signal reçu afin d'aboutir à une réponse cellulaire complète et adaptée au signal reçu.

#### A. Les acteurs de la voie Ras/MAPK

On distingue différents récepteurs membranaires répondant aux facteurs de croissance capables d'activer la voie Ras/MAPK notamment le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et les autres membres de la famille HER (Human epidermal growth factor receptor) et l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor). Les récepteurs à activité de tyrosine kinase vont être activés en amont par l'intermédiaire de différents ligands (peptides, protéine solubles ou liées à une membrane) tels que le NGF (Nerve Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le FGF (fibroblast growth factor), le EGF (Epidermal Growth Factor) et l'insuline. Les récepteurs peuvent être également activés par les cytokines, les ligands des RCPG (récepteur couplé aux protéines G) et le sérum (Raman et al., 2007). Le module Ras/MAPK est composé de plusieurs acteurs, participant à l'activation linéaire de la voie suite à un signal extérieur : les MAPKKK sérine/thréonine kinases connues comme Raf (Rapidly accelerated fibrosarcoma) comprenant les isoformes A-Raf, B-Raf et Raf-1, les MAPKK des tyrosine/thréonine kinases appelées MEK1 et MEK2 et enfin des MAPK des sérine/thréonine kinases connues sous le sigle ERK1 et ERK2. Ces kinases jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération et la survie qui sont des facteurs essentiels à la

transformation des cellules et à la progression du cancer. Cette voie va être sujet à de nombreuses mutations activatrices touchant principalement les kinases Ras (30% des cancers) et Raf (20% des cancers) (Fremin and Meloche, 2010).

## B. Activation de la petite GTPase Ras

La famille des proto-oncogènes Ras est composée de trois gènes *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Leur profil d'expression est dépendant des tissus. Les protéines sont situées sur la face interne de la membrane plasmique (Wright and Philips, 2006). Elles sont fixées grâce à leur extrémité C-terminale dans la couche phospholipidique de la membrane. Ras fait partie de la famille des petites GTPases. Les protéines Ras agissent comme des « interrupteurs moléculaires ». Elles peuvent osciller entre un état actif lorsqu'elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) et un état inactif lorsqu'elles sont liées au GDP (Guanosine Diphosphate) (Dickson et al., 1992; Ong et al., 2001). La forme active interagit avec des composants intracellulaires de la voie Ras/MAPK et aussi de la voie PI3K/Akt.

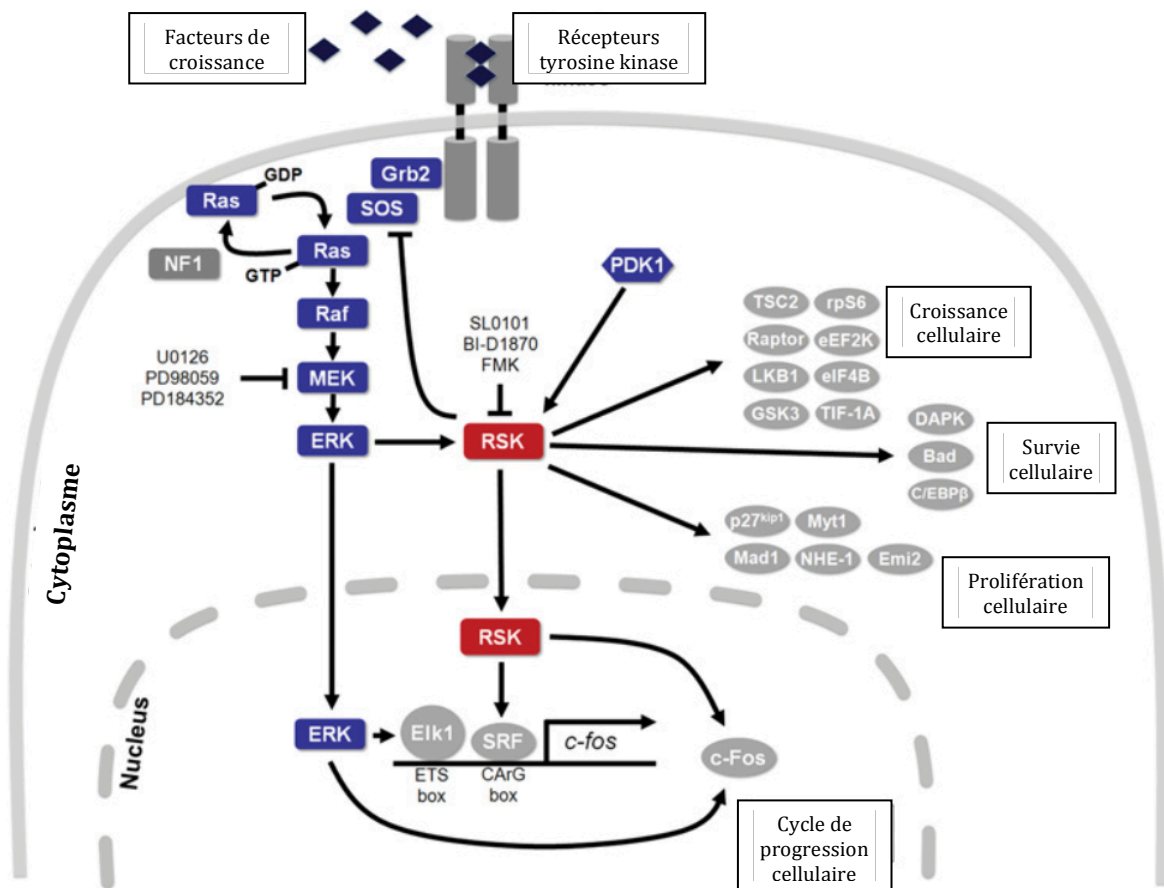
La forme activée de Ras est définie lorsque le GDP est remplacé par le GTP tandis que son inactivation est la conséquence de l'hydrolyse du GTP en GDP. Ces deux phases sont régulées par des facteurs d'échange GEF (Guanine nucleotide exchange factor) et des facteurs activateurs GAP (GTPase-Activating Proteins). Les facteurs d'échange GEF favorisent le relargage du GDP permettant la liaison de Ras avec le GTP ayant pour effet d'induire son activation. Alors que la GAP va favoriser l'hydrolyse du GTP ayant pour conséquence de pousser le retour de Ras dans un état inactif lié au GDP (Ahearn et al., 2012). L'activation des récepteurs membranaires RTK lors de leur interaction avec des facteurs de croissance va induire leur dimérisation et leur autophosphorylation en tyrosine sur leur queue cytoplasmique. Cette étape va permettre le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor Receptor Bound protein 2), via son domaine SH2 (Src Homology 2), elle-même associée à la protéine SOS (Son Of Sevenless). Cette dernière possède une activité GEF spécifique envers Ras permettant ainsi son activation (Vigil et al., 2010). L'activation excessive de Ras due à plusieurs mutations a été constatée dans les cas de cancers chez l'homme. En effet, *KRAS* est un oncogène

fréquemment retrouvé muté dans 30% des cancers tels que les cancers du pancréas (> 60), colorectaux (~40%) et broncho-pulmonaires (15-40%). Les mutations activatrices affectant NRAS et HRAS sont généralement constatées dans les mélanomes (20-30% pour N-Ras). Ces mutations vont induire une activité constitutive de la voie Ras/MAPK qui permet à la cellule tumorale de proliférer abondamment tout en contournant les processus de mort cellulaire (Takashima and Faller, 2013).

### C. Les protéines kinases Raf/MEK/ERK

L'activation de la protéine Ras va induire une activation en cascade des acteurs de la voie Ras/MAPK. Ras activée va permettre le recrutement de la famille des sérine/thréonine kinases Raf à la membrane plasmique. Raf est présent dans le cytoplasme sous une forme inactive dite de conformation fermée. Son interaction avec Ras via le domaine RBD (Ras Binding Domain), situé sur l'extrémité N-terminale de Raf, va permettre son recrutement à la membrane plasmique. Cette interaction va permettre à Raf d'adopter une conformation ouverte permettant de débloquent son domaine catalytique situé sur son extrémité C-terminale. Raf est activée par des phénomènes de phosphorylation et de dimérisation (Luo et al., 1996; Mason et al., 1999; Terai and Matsuda, 2005). Le complexe Ras/Raf va permettre la translocation de la protéine d'échafaudage KSR (Kinase Suppressor of Ras) à la membrane plasmique agissant sur l'activation de la protéine Raf lors de leur dimérisation (Rajakulendran et al., 2009). La protéine d'échafaudage KSR est constitutivement liée à la Kinase MEK et va également recruter Raf et ERK lors de l'activation de la voie. Ainsi, le regroupement des kinases de la voie Ras/MAPK par la protéine KSR va favoriser leurs activations (Udell et al., 2011). Les protéines MEK1/2 activées par phosphorylation directe par Raf sont des kinases de la famille sérine-thréonine/tyrosine kinase. Les kinases MEK vont par la suite activer les kinases ERK1/2 par phosphorylation au sein des motifs conservés de leur Thr-Glu-Tyr (TEY) de leur boucle d'activation. Enfin, l'activation des kinases ERK1/2, des sérine/thréonine kinases dont le motif consensus de phosphorylation est Thr/Ser-Pro va induire la phosphorylation de plus de 150 substrats (facteurs de transcription, protéine régulatrice de la prolifération...). Un des premiers substrats directs de ERK à être caractérisé sont les protéines RSK

(Cargnello and Roux, 2011). Tout comme la protéine Ras, Raf arbore de nombreuses mutations activatrices retrouvées dans un grand nombre de cancers. En effet, la protéine B-Raf est abondamment mutée dans les mélanomes (44%), les cancers de la thyroïde (35-70%), les cancers des ovaires (30%) et les cancers du colon (14%) (Fremin and Meloche, 2010). B-RAF<sup>V600E</sup> a été constatée dans près de 90% des cancers présentant une mutation B-Raf.



Reproduced with permission from (Romeo et al., 2012), Copyright the Biochemical society

**Figure 3 La voie de signalisation Ras/MAPK**

Les facteurs de croissance vont se lier et activer les récepteurs tyrosine kinase par autophosphorylation. Les récepteurs activés vont recruter la protéine adaptatrice Grb2 et permettre la translocation de SOS. Ceci va permettre l'activation de Ras qui à son tour va activer Raf. Il s'ensuit une activation en cascade des différentes kinases de la voie de signalisation: MEK, ERK, RSK. Ces dernières kinases vont activer un grand nombre de substrats afin de répondre aux stimuli reçus par la cellule, induire la croissance et la prolifération cellulaire. Cette voie de signalisation peut être bloquée à différents



niveaux par l'intermédiaire d'antagonistes spécifiques comme PD184352, U0126 et PD98059 qui sont des inhibiteurs de MEK, BI-D1870, SL0101 et FMK qui sont eux-mêmes des inhibiteurs de RSK(Romeo et al., 2012).

#### D. La famille des kinases RSK

La famille RSK (90 kDa ribosomal S6 kinase) est composée de kinases sérine/thréonine régulant de nombreux processus biologiques comme la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la mobilité. Cette famille est composée de quatre isoformes chez les vertébrés (RSK1, RSK2, RSK3, et RSK4), ces isoformes possèdent une forte homologie de séquences (73-80%). La partie présentant le plus de divergences entre chaque membre se situe au niveau de leurs extrémités N- et C-terminale. Ces kinases possèdent deux domaines phosphotransférases fonctionnelles et non identiques, le NTKD (amino- Terminal Kinase Domain) et le CTKD (carboxy-Terminal Kinase Domain). Ces deux domaines kinases sont liés via une région centrale de 100 acides aminés. Cette région joue un rôle essentiel dans la régulation et l'activation du domaine NTKD. Comme elles possèdent deux domaines catalytiques distincts, RSK fait partie de deux familles différentes de kinases. Le domaine CTKD de RSK appartient à la famille des kinases CAMK (Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase) dont fait partie les protéines AMPK (AMP-activated protein kinase), MARK (MAP-regulating kinase/microtubule affinity-regulating kinase) et DAPK (death-associated protein kinase). La partie NTKD appartient à la famille des kinases AGC (protein kinase A, G and C) qui inclut les protéines kinases Akt, PKC et S6K (Fisher and Blenis, 1996). Le domaine NTKD de RSK est responsable de la phosphorylation des substrats. Le domaine CTKD a pour rôle d'activer le domaine NTKD via une autophosphorylation de RSK. C'est la seule fonction connue à ce jour pour le domaine CTKD.

L'ensemble des isoformes de RSK possèdent quatre sites de phosphorylation essentiels à leur activation (Ser221, Ser363, Ser380 et Thr573 pour RSK1)(Anjum and Blenis, 2008). L'activation de RSK fait intervenir deux autres kinases : ERK et PDK1. La protéine ERK activée se lie au motif KIM puis phosphoryle le domaine CTKD sur la thréonine 573 (selon la séquence de RSK1 humain).

L'action de ERK permet l'autophosphorylation de RSK sur son domaine hydrophobique en Sérine 380. ERK peut également phosphoryler la thréonine 359 et la sérine 363. Ces différentes phosphorylations vont permettre le recrutement de la kinase PDK1 (3'- phosphoinositide-dependent protein kinase 1), une kinase sérine/thréonine constitutivement active. La protéine kinase PDK1 phosphoryle la sérine 221 située sur le domaine NTKD de RSK permettant de compléter la boucle d'activation de RSK. Par la suite, l'autophosphorylation sur la sérine 737 par le domaine NTKD va induire la dissociation de ERK fixée sur le domaine KIM (Roux et al., 2003). Enfin, RSK va activer par phosphorylation différents substrats cellulaires via son domaine NTKD. RSK phosphoryle ses substrats en identifiant une séquence motif définie comme tel Arg-X-X-Ser/Thr (où X représente un acide aminé quelconque) (Galan et al., 2014).

## VI. MDM2 : une E3 ubiquitine ligase

MDM2 appartient à une large famille de protéines contenant un RING-finger (really interesting gene). Comme la plupart des membres de cette famille, la protéine MDM2 est une E3 ubiquitine ligase, son rôle est de mono- et/ou poly-ubiquitiner une variété de substrats afin de réguler leurs activités. Le gène MDM2 a été identifié sur les chromosomes minuscules doubles (fragment chromosomique de petite taille dénué de centromère) des fibroblastes spontanément transformés de souris 3T3. MDM2 a été montrée pour interagir physiquement avec l'hélice  $\alpha$  présente dans la partie N-terminale du domaine de transactivation de la protéine tumeur suppresseur p53 (Kussie et al., 1996). MDM2 joue un rôle physiologique important comme en témoigne la létalité embryonnaire au stade E6,5 des souris présentant une délétion du gène MDM2 (Jones et al., 1995). Cette létalité a été contournée lors de la co-délétion des gènes MDM2 et p53 (Montes de Oca Luna et al., 1995). Cette observation démontre l'important rôle qu'exerce MDM2 sur p53 (Moll and Petrenko, 2003). Le suppresseur de tumeur p53 est un des principaux médiateurs de l'arrêt de la croissance, la sénescence et de l'apoptose en réponse à un large éventail de dommages cellulaires (Zilfou and Lowe, 2009). La rapide induction du niveau

protéique de p53 par une variété de stress permet d'empêcher une propagation inappropriée des cellules endommagées. p53 est un facteur de transcription qui déclenche une variété de fonctions antiprolifératives (l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire et la sénescence) via l'induction de nombreux gènes favorisant cette action. Le niveau protéique de p53 est donc conservé à un niveau bas dans les cellules non stressées par l'intermédiaire de MDM2 qui induit sa dégradation (Wade et al., 2013).

#### A. Dégradation protéique par l'E3 ubiquitine ligase

La dégradation des protéines par le protéasome (Ubiquitin Proteasome System ;UPS) permet à la cellule de réguler négativement des protéines intracellulaires spécifiques. La dégradation des protéines permet de maintenir la qualité des protéines, l'activité des voies de signalisation cellulaire et la progression du cycle cellulaire.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui a pour but de marquer les protéines avec une ou plusieurs protéines d'ubiquitine (Ub) (Komander and Rape, 2012). L'ubiquitination joue un rôle dans la signalisation cellulaire, le trafficking des protéines mais elle est plus souvent étudiée pour son rôle dans le marquage des protéines permettant au protéasome de reconnaître les protéines à dégrader (Deshaies and Joazeiro, 2009). La cascade d'ubiquitination commence par l'activation de l'enzyme E1 via une charge d'ATP. Cette activation va permettre la formation d'une liaison thioester entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine du site actif de la E1. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la cystéine du site actif de l'enzyme E2 par une réaction de transthioestérification. Enfin, une E3 ligase va catalyser le transfert de l'ubiquitine, présente sur la cystéine du site actif de l'E2, vers une lysine ou vers la partie N-terminale d'une protéine cible (Deshaies and Joazeiro, 2009). Il y a trois classes d'E3 ligases : les RING E3 se lient avec le complexe E2-Ub et le substrat afin de transférer directement l'ubiquitine sur le substrat (Budhidarmo et al., 2012; Metzger et al., 2012; Ranaweera and Yang, 2013). Les deux autres classes HECT et RBR E3s se lient également au complexe E2-Ub et au substrat. La présence d'une cystéine sur leur site actif va impliquer une ubiquitination en deux étapes. L'ubiquitine provenant de l'E2 va être transférée sur la cystéine de l'E3 ligase. L'E3 ligase va par la

suite transférer l'ubiquitine sur une lysine ou sur la partie N-terminale du substrat. (Berndsen and Wolberger, 2014; Deshaies and Joazeiro, 2009; Huijbregtse et al., 1995; Wenzel and Klevit, 2012).

Certaines protéines vont être ubiquitinées sur un résidu lysine une seule fois, on parle de mono-ubiquitination. Cette forme d'ubiquitination a été montrée comme jouant un rôle dans les réponses au dommage à l'ADN (Komander, 2009; Komander and Rape, 2012; Sigismund et al., 2004). D'autres protéines vont être ubiquitinées sur plusieurs résidus lysines une seule fois, on parle de multi mono-ubiquitination. Cette dernière a été montrée comme jouant un rôle dans le trafficking et la dégradation des récepteurs (Haglund et al., 2003). Enfin, les protéines ciblées par les E3 ligases peuvent être poly-ubiquitinées, c'est-à-dire posséder plusieurs ubiquitines sur une même lysine. Ce dernier marquage protéique donne lieu à la naissance de différents polymères. En effet, les ubiquitines vont se lier entre elles par l'intermédiaire de leurs lysines. La connection par les lysines 48, présentes sur la protéine cible, est abondamment étudiée car cette connection marque les protéines qui doivent être dégradées via le protéasome 26S (Komander, 2009; Komander and Rape, 2012). MDM2 est une E3 ligase qui va ubiquitiner un très grand nombre de substrats permettant une rapide et forte modification physiologique de la cellule (Fahraeus and Olivares-Illana, 2014). Afin de réguler leurs activités, les E3 ligases vont subir de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations.

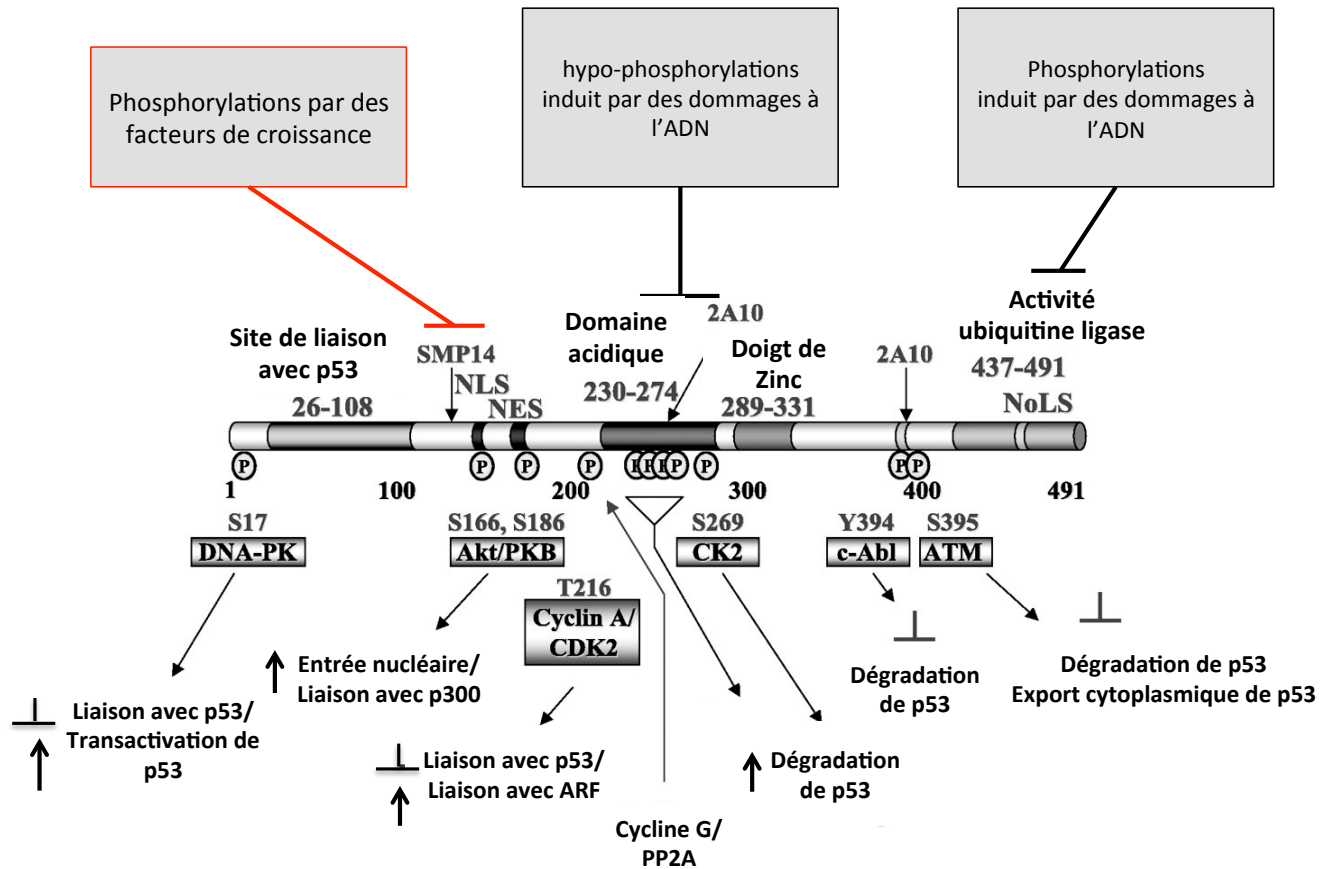
## **B. Structure et modification post-traductionnelle de MDM2**

La structure de MDM2 comprend plusieurs domaines qui ont des rôles bien distincts. MDM2 possède, un domaine de liaison avec p53 dans sa région N-terminale. La liaison entre MDM2 et p53 va permettre d'inhiber l'activité transcriptionnelle du tumeur suppresseur en bloquant son domaine N-terminal de trans-activation (Oliner et al., 1993). MDM2 possède également une région contenant des séquences d'import et d'export nucléaire facilitant sa translocation du noyau au cytoplasme ainsi que celle de p53 (Tao and Levine, 1999a; Yu et al., 2000). Le domaine acide de MDM2 est hautement phosphorylé car c'est une région qui joue un rôle critique dans l'ubiquitination de p53 et de MDM2 lui-même (Kawai et al., 2003). Le domaine Zinc finger de MDM2 est encore très mal étudié cependant

certaines études montrent son importance dans l'interaction avec des protéines ribosomales (Lindstrom et al., 2007). Enfin dans la partie C-terminale de MDM2, le domaine RING finger permet de transférer l'ubiquitine sur un substrat spécifique comme p53 (Figure 4).

Ces domaines sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, cette modification permet de réguler l'activité de MDM2. Près de 20% des acides aminés de la protéine MDM2 sont des sérines ou des thréonines, ceci nous permet de mieux comprendre l'impact du rôle de la phosphorylation sur la régulation de l'activité de MDM2. On distingue deux grandes régions fortement phosphorylées, le domaine N-terminal (acides aminés 1-193) et le domaine central (acides aminés 194-293) de MDM2 (Hay and Meek, 2000). Les principaux sites de phosphorylation et leurs kinases sont : ser166 (Akt), ser186 (Akt), thr219 (cyclin A-CDK1/2), ser229, ser232, ser240, ser242, ser246, ser253, ser256, ser260, ser262, ser269 (CK2), tyr294 (c-Abl), et la ser295 (ATM, ataxia telangiectasia- mutated ) (Figure 4). Nous pouvons constater que seule Akt, faisant partie de la voie PI3K, est activée par des facteurs de croissance. La protéine kinase PI3K va être activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1). La protéine PI3K va par la suite phosphoryler le PIP2 pour former du PIP3. Cette réaction est négativement contrôlée par PTEN qui déphosphoryle le PIP3. Le PIP3 ainsi formé va permettre de recruter PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) et Akt à la membrane plasmique. PDK1 va par la suite phosphoryler la kinase Akt recrutée à la membrane via son domaine Pleckstrin Homology (PH), sur le résidu thréonine 308 situé dans sa boucle d'activation. La protéine kinase Akt va subir une deuxième phosphorylation conduite par la kinase mTORC2 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 2) au sein de son motif hydrophobe sur la sérine 473 permettant de finaliser l'activation de Akt (Engelman, 2009; Manning and Cantley, 2007). Akt a été montrée pour phosphoryler MDM2 sur les Ser166 et 186, ces acides aminés se trouvent à proximité d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et d'une séquence d'export nucléaire (NES). Des études suggèrent que la phosphorylation de ces sérines 166 et 186 stimule l'entrée de MDM2 dans le

noyau (Mayo et al., 2002; Zhou et al., 2001). Cependant cette hypothèse reste encore mal étudiée car d'autres études montrent que la phosphorylation de MDM2 en Ser166 et 186 n'a aucun impact sur sa localisation cellulaire (Ogawara et al., 2002). Il a été également mentionné que la phosphorylation de MDM2 en Ser166 et 186 joue un rôle important dans la polyubiquitination de p53. En effet, la phosphorylation de MDM2 permettrait premièrement d'accroître son interaction avec P300, un co-activateur favorisant la poly-ubiquitination de p53, et deuxièmement d'inhiber l'interaction de MDM2 avec ARF, une protéine qui inhibe l'activité de MDM2 (Grossman et al., 2003; Grossman et al., 1998; Zhou et al., 2001). Enfin, la phosphorylation de MDM2 en Ser166 et 186 par Akt conduit à une augmentation de la stabilité protéique due à une diminution de sa capacité à s'auto-ubiquitiner (Feng et al., 2004; Ogawara et al., 2002). Le rôle fonctionnel de la phosphorylation en Ser166 et 186 de MDM2 et l'étude des kinases qui y sont associées, reste encore mal compris.



Reproduced with permission from (Meek and Knippschild, 2003), Copyright American Association for cancer research.

**Figure 4 Structure et régulation post-traductionnelle de MDM2**

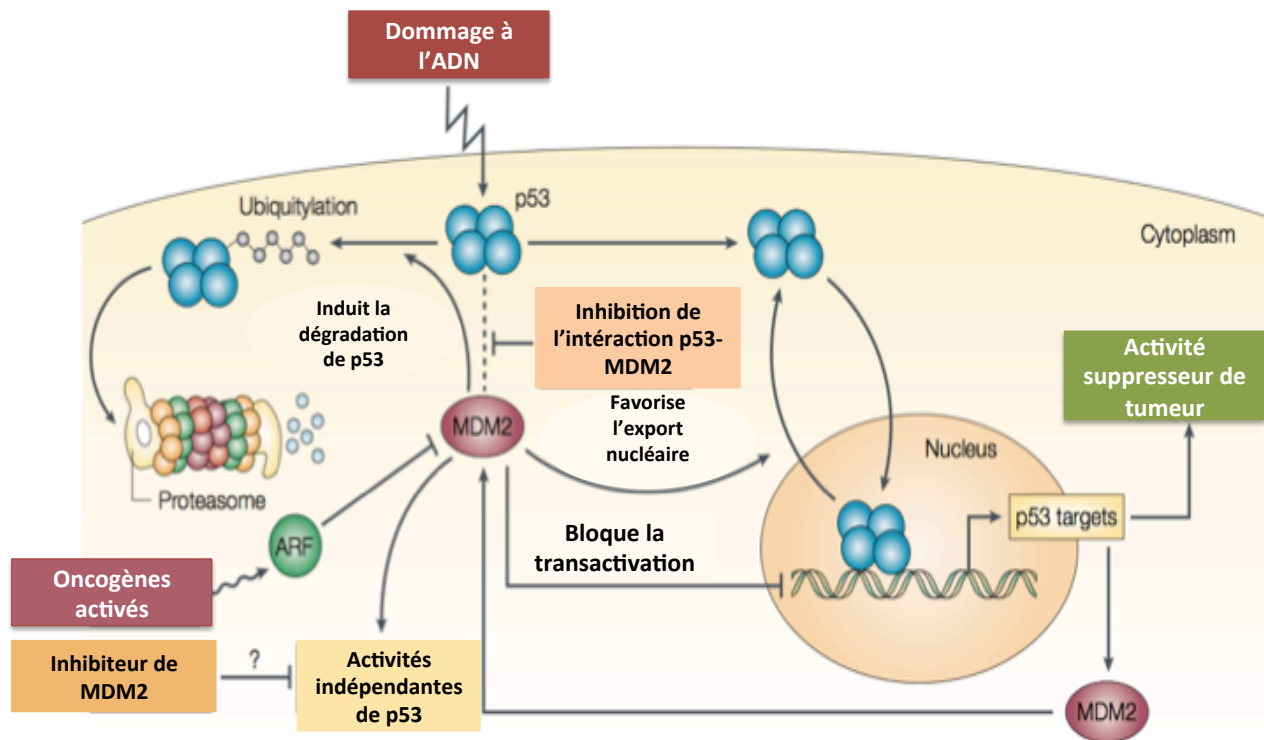
Représentation des domaines fonctionnels et des sites de phosphorylation de MDM2. Les domaines fonctionnels de MDM2 sont, le site de liaison de p53, la NLS, la NES, le domaine acide, le Doigt de Zinc (Zing finger), le domaine ubiquitine ligase (RING finger) et une séquence de localisation nucléaire (NoLS). SMP14 et 2A10 sont les anticorps commerciaux ciblant MDM2 (Meek and Knippschild, 2003).

### C. Relation entre p53 et MDM2

MDM2 est une E3 ubiquitine ligase qui a pour rôle de poly-ubiquitiner plusieurs lysines de p53. La poly-ubiquitination de p53 va permettre de bloquer son activité transcriptionnelle, de l'exporter du noyau et par la suite d'induire sa dégradation via le protéasome (Haupt et al., 1997). MDM2 est une cible transcriptionnelle de p53 permettant de maintenir son niveau protéique au plus bas dans les cellules non stressées. Enfin MDM2 est capable de s'auto-ubiquitiner afin d'induire sa propre

dégradation (Fang et al., 2000; Honda and Yasuda, 2000; Itahana et al., 2007). La relation entre MDM2 et p53 s'organise autour d'une boucle d'autorégulation (Moll and Petrenko, 2003; Wu et al., 1993) (Figure 5). A la suite d'un dommage à l'ADN ou un autre stress cellulaire, p53 et MDM2 sont phosphorylées afin d'empêcher leurs interactions et ainsi d'augmenter la stabilité de p53 (Moll and Petrenko, 2003). De même, l'activation d'oncogènes favorise l'expression de la protéine ARF, qui va permettre de séquestrer MDM2 dans le nucléole, empêchant ainsi la dégradation de p53 (Honda and Yasuda, 1999; Tao and Levine, 1999b; Weber et al., 1999). Inversement, les facteurs de croissance, qui vont activer notamment la kinase Akt, induisent l'import nucléaire de MDM2 favorisant la dégradation de p53 (Moll and Petrenko, 2003). Il a été démontré que les cellules cancéreuses peuvent contourner la réponse aux dommages à l'ADN en modifiant le niveau protéique de MDM2 (Meek and Knippschild, 2003; Rayburn et al., 2005). Ainsi, la surexpression de MDM2 et la résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques semblent corrélées. MDM2 est fortement exprimée dans les cellules de mélanomes, mais son gène est rarement amplifié (Onel and Cordon-Cardo, 2004; Polsky et al., 2001). Les régulations post-transcriptionnelles de MDM2 semblent être une étape critique dans la progression du mélanome et dans sa capacité à résister aux chimiothérapies conventionnelles.





Reproduced with permission from (Chene, 2003), Copyright Nature publishing group.

**Figure 5 Boucle d'autorégulation entre MDM2 et p53**

p53 stimule l'expression de MDM2 tandis que MDM2 inhibe l'activité de p53 en bloquant son activité transcriptionnelle et en favorisant son export nucléaire afin de stimuler sa dégradation. Cette relation forme une boucle d'autorégulation car MDM2 est capable de s'autoréguler par polyubiquitination (Chene, 2003).

## Chapitre 2 : MISE EN CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET DE MAITRISE

Comme vue précédemment, la voie de signalisation Ras/MAPK est fréquemment hyperactive dans différents types de cancers, incluant les mélanomes. En effet, la mutation de l'oncogène B-RAF apparaît dans 70% des tumeurs. Les tumeurs malignes sont hautement invasives et résistantes aux formes communes de chimiothérapies. La protéine kinase RSK est directement activée par la voie MAPK et régule différentes protéines nécessaires à la croissance et la prolifération cellulaire. RSK est

hyperactive dans les mélanomes ayant une mutation B-RAF, mais son rôle exact dans la progression tumorale reste mal compris. Il a été montré que la mutation B-RAF et l'inactivation du suppresseur de tumeurs Tp53 sont essentielles pour la transformation des mélanocytes en cellules malignes (Patton et al., 2005). Cependant, les mutations TP53 sont rares dans les mélanomes, l'inactivation de p53 est généralement corrélée avec une surexpression de MDM2. Il a été démontré que les cellules cancéreuses peuvent contourner la réponse aux dommages à l'ADN en modifiant le niveau protéique de MDM2 (Meek and Knippschild, 2003; Rayburn et al., 2005). Ainsi, la surexpression de MDM2 et la résistance des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques semblent corrélées (Eton et al., 1998; Kakehi et al., 1998). MDM2 est fortement exprimée, mais son gène est rarement amplifié dans les cellules de mélanome (Polsky et al., 2001). Ainsi, la régulation post-transcriptionnelle et/ou traductionnelle de MDM2 semble être une étape critique ayant pour effet la résistance aux chimiothérapies conventionnelles. Des études antérieures montrent que la kinase AKT est capable de phosphoryler MDM2 sur les sérines 166/186/188 ayant pour effet d'augmenter sa stabilité résultant d'une diminution de son auto-ubiquitination (Feng et al., 2004; Ogawara et al., 2002). Mais les études sur la relation entre AKT et MDM2 sont très controversées. Nous avons constaté que les sérines 166 et 186 abordent un consensus motif de phosphorylation reconnu par la plupart des kinases AGC (Pearson and Kemp, 1991). La régulation de MDM2 à travers les sites Ser166/186 par d'autres kinases AGC peut donc être envisagée. Or, la kinase RSK, partie intégrante de la voie Ras/MAPK, est une kinase AGC. Cette kinase peut probablement phosphoryler plus spécifiquement MDM2 au même site que la kinase AKT.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la kinase **RSK est un important régulateur de l'activité de MDM2 et contribue ainsi à la progression et la chimiorésistance des mélanomes.**

Mon projet de maitrise comporte trois objectifs principaux. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la phosphorylation de MDM2 par la kinase RSK. Ce premier point a été développé avant

mon arrivée dans le laboratoire par un étudiant à la maîtrise Patrick Lacasse et Julie Moreau. Dans un second temps, j'avais pour objectif de caractériser le rôle fonctionnel de la phosphorylation de MDM2 par la protéine kinase RSK. Enfin, j'ai eu pour but d'évaluer le rôle de la kinase RSK dans la réponse au dommage à l'ADN et la chimiorésistance des mélanomes.

## Chapitre 3 : MATERIELS ET METHODES

- Plasmide et mutagenèse

Les plasmides RSK codant pour hRSK1, mRSK2, avRSK1, avRSK1-K112/464R (inactive kinase) et le plasmide Myr-avRSK1 (constitutivement actif) ont été décrits lors d'une précédente étude (Roux et al., 2004). Le plasmide codant pour HDM2 forme humaine de MDM2 marqué myc (pCMV-Myc3-HDM2) provient d'Addgene (Cambridge, MA, USA). Le mutant HDM2 S166/186A a été produit à l'aide d'une mutation dirigée sur le vecteur pCMV-Myc3-HDM2 grâce à la méthode QuikChange de Stratagene (La Jolla, CA, USA). Les plasmides codant pour Ras<sup>G12V</sup>, B-RAF<sup>V600E</sup> marqué HA et MEK1-DD (S218D, S222D) forme constitutivement active marqué Flag ont été décrits lors d'une précédente étude de notre laboratoire (Carrière A et al., 2008). Les constructions shRNA proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich (shRSK1, TRCN470; shRSK2, TRCN537).

- Anticorps et réactifs

Les anticorps ciblés contre phospho-MDM2 (Ser166) #3521, p53 #2527 et #9282, Akt, phospho-Akt (Ser473) #9271, ERK1/2 #9102, phospho-ERK1/2 (T202/Y204) #9106, S6 #9202, phospho-S6 #4856 ont été achetés auprès de la compagnie Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Les anticorps ciblés contre ubiquitine, RSK1 (C-21) et MDM2 (SMP14) ont été achetés auprès de la compagnie Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anticorps phospho-RSK (Ser380) a été acheté auprès de la compagnie R&D Systems (Minneapolis, MN). L'anticorps  $\beta$ -actine a été acheté auprès de la compagnie Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Les anticorps anti-myc anti-HA ont été fabriqués par le laboratoire du Dr. Roux. L'ensemble des anticorps secondaires conjugués au horseradish peroxidase

(HRP) utilisés pour la révélation des western blot ont été achetés auprès de la compagnie Chemicon (Temecula, CA). Les réactifs suivants ont été utilisés pour traiter les cellules : wortmannin (100 nM), U0126 (10  $\mu$ M), PI-103 (1  $\mu$ M) PD184352, BI-D1870, (Biomol, Plymouth Meeting, PA), Nutlin-3 (30  $\mu$ M) (Cayman Chemicals, Ann-Harbor, Michigan), MG132 (10  $\mu$ M), cycloheximide (50  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich), FBS (fetal bovine serum) (10%), insuline (25 to 100 nM), EGF(Invitrogen, Carlsbad, CA) (25 ng/ml), et PMA (phorbol 13-myristate 12-acetate) (25 ng/ml) (Biomol, Plymouth Meeting, PA).

- Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK293 et A375 ont été maintenues à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec 4.5 g/litre de glucose supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et aux antibiotiques (Pénicilline et streptomycine). Les cellules Colo829 ont été maintenues à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et les antibiotiques (Pénicilline et streptomycine). Les lignées cellulaires de mélanocytes humaines normales (105 - 25N) ont été maintenues à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture mélanocytes Growth Medium (135-500, Cell Applications). Les lignées cellulaires WM852 ont été maintenues dans un milieu composé de MCDB 153 et Leibovitz L-15 en proportion 4 :1 supplémenté avec 2% de FBS, 1.69 mM CaCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g/ml d'insuline et d'antibiotiques. Les cellules ont été cultivées au nombre de 2,5 Millions dans des plaques 10 cm ou 0,3M / puits. Les cellules HEK293 ont été cultivées pendant 24h avant leur transfection par précipitation au phosphate de calcium. 24h post transfection, les cellules ont été cultivées dans un milieu dépourvu de sérum pendant 16 à 18h. Par la suite, les cellules ont été traitées avec les drogues tels que wortmannin (100 nM), U0126 (10  $\mu$ M), PI-103 (1  $\mu$ M) (Biomol, Plymouth Meeting, PA), PD184352, BI-D1870, Nutlin-3 (30  $\mu$ M), MG132 (10  $\mu$ M), ou cycloheximide (50  $\mu$ g/mL) et/ou stimulées avec du FBS (10%), de l'insuline (25 à 100 nM), de l'EGF (25 ng/ml), ou du PMA (25 ng/ml) pendant plusieurs minutes avant d'effectuer la lyse cellulaire. Les

cellules sont grattées et lysées dans du BLB (10 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-glycerophosphate, 5 mM EGTA, 0.5% NP-40, 0.1% Brij-35, 1 mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL pepstatin A). Les cellules non déprivées en sérum sont cultivées pendant 48h avant d'être récoltées. Les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et utilisés pour des immunoprécipitations ou des immunoblottings.

- Immunoprécipitation

Les lysats cellulaires sont incubés et agités en présence d'anticorps anti-myc ou anti-ubiquitine pendant 2h à 4°C puis mis en présence de billes protéine A-Sepharose (GE Healthcare) pendant 1h à 4°C sous agitation. Les billes sont par la suite lavées trois fois avec du BLB (10 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM β-glycerophosphate, 5 mM EGTA, 0.5% NP-40, 0.1% Brij-35) avant d'ajouter 50 µl de Laemmli buffer 2X.

- Immunoblotting

Les lysats cellulaires sont chauffés à 100 °C dans un thermoblock pendant 5min afin de dénaturer les protéines, puis les lysats sont chargés pour migration sur un gel acrylamide SDS-PAGE à 10%. Un marqueur de poids protéique couvrant 10 à 170 kDa, le PageRuler prestained (Fermentas, Thermo Scientific, CAN) est utilisé comme référence. Les protéines migrées sont par la suite transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) par electroblotting à 750 mA pendant 2h. Les membranes sont ensuite bloquées avec une solution de TBST (3% NaCl 5M, 2%Tris 1M pH 8, 0,2% Tween 20 solution 50% in water) complétée de 5% de lait en poudre pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois avec la solution TBST. Les anticorps primaires sont utilisés suivant les instructions du fournisseur et agités toute la nuit à 4°C. Après cette étape, les membranes sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec une solution de TBST puis incubées en présence de l'anticorps secondaire Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit ou anti-mouse avec une dilution 1:10000 pendant 1 à 2h. Les membranes sont par la suite lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du TBST. Enfin l'immunoblot est développé par l'intermédiaire de chimioluminescence (ECL).

Certains échantillons ont été quantifiés grâce à un essai Bradford (Bio-Rad) afin de normaliser leur concentration protéique. L'intensité des bandes a été analysée et quantifiée grâce au logiciel informatique FUJI Multi Gauge V3.

- Quantitative Real-Time PCR et extraction d'ARN

L'ARN messenger provenant des lignées cellulaires étudiées a été extrait par l'intermédiaire du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les ARN totaux ont été inversement transcrits en cDNA en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). L'ensemble des résultats générés par qPCR a été normalisé avec le gène de contrôle GAPDH.

- Ubiquitination TUBE assay (Tandem Ubiquitin Binding Entites)

La technique de Tandem Ubiquitin Binding Entites (TUBE) est basée sur les domaines UBA qui possèdent une forte affinité pour l'ubiquitine. Cette technique a été développée pour isoler et identifier les protéines ubiquitinées. TUBE montre une forte affinité avec les complexes de poly-ubiquitination. De plus, cette technique permet de protéger les protéines poly-ubiquitinées de l'action des deubiquitinases et de l'action du protéasome. Le kit TUBE provient de la compagnie LifeSensor.

## Chapitre 4: RÉSULTATS

### I. L'activation de la voie de signalisation MAPK induit la phosphorylation de MDM2.

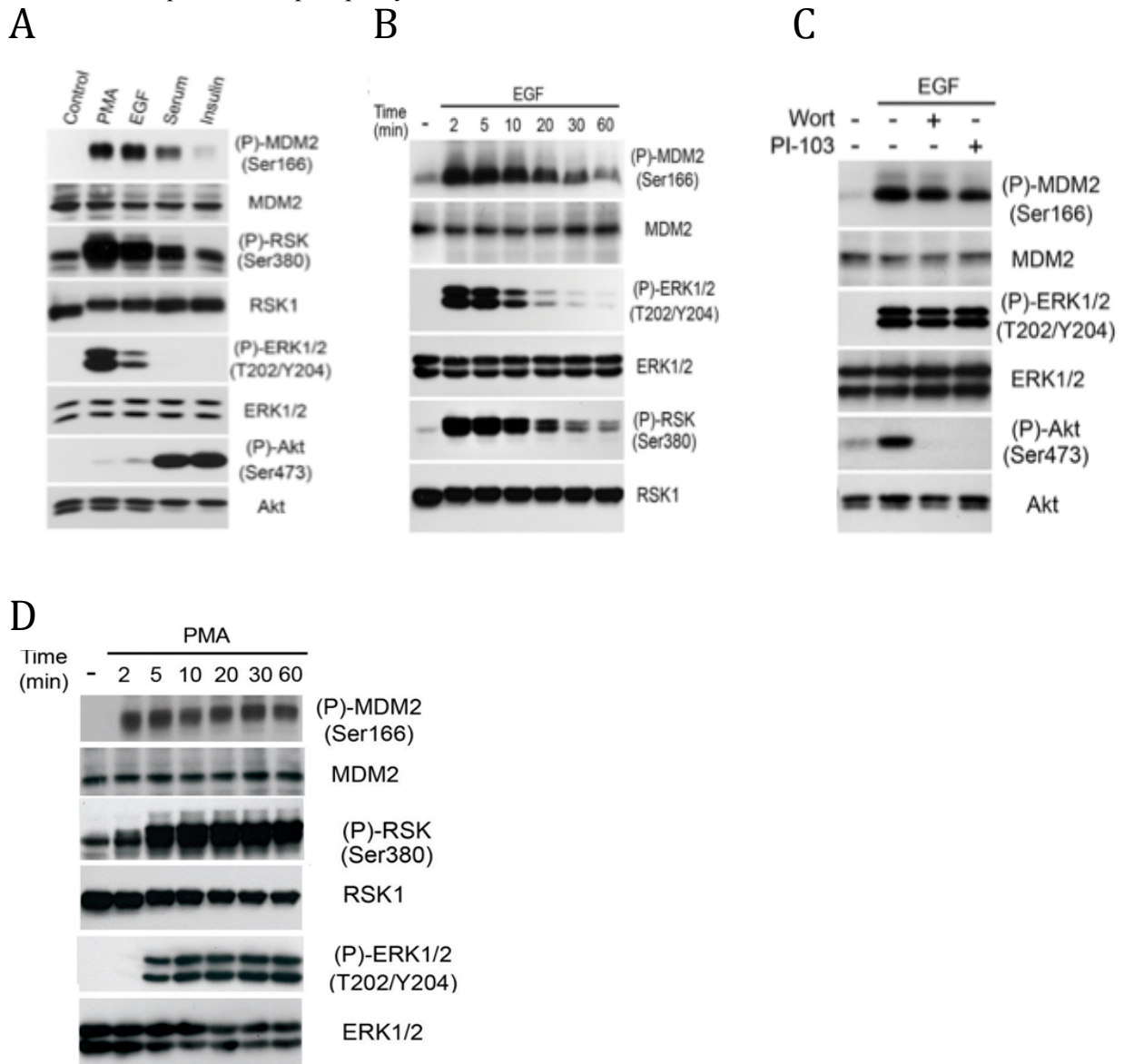
La fonction de MDM2 est hautement régulée par de multiples sites de phosphorylation. Comme expliqué précédemment, les sites de phosphorylation Ser166 et Ser186 sont phosphorylés après la stimulation par des facteurs de croissance activant ainsi plusieurs voies de signalisation (Marine, J.C. and A.G. Jochemsen, 2004). Des études antérieures ont montré que ces sites de phosphorylation sont dépendants de l'activation de la kinase Akt faisant partie de la famille des kinases AGC.

Nous montrons dans des cellules HEK293, cultivées sans sérum, que la stimulation et l'activation de la voie Ras/MAPK participe à la phosphorylation de MDM2 en Ser166. Pour cela, nous utilisons des

agonistes ciblant préférentiellement la voie MAPK ou PI3K, afin de comparer l'impact des différentes stimulations sur la phosphorylation en Ser166 de MDM2. La voie MAPK va être préférentiellement activée par deux agonistes qui sont: le PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate), un activateur de la protéine kinase PKC qui va activer la voie MAPK par l'intermédiaire de C-Raf (Ueda et al., 1996), et l'EGF activant les récepteurs EGFR.

L'insuline va plus spécifiquement activer la voie PI3K/Akt. La stimulation des cellules en présence de sérum permet d'activer les deux voies simultanément. Lors de cette expérience, nous pouvons remarquer que la phosphorylation sur la Ser166 est davantage corrélée avec une stimulation de la voie MAPK en comparaison avec l'intensité du signal observé lors de l'activation de la voie PI3K/Akt. En effet, les traitements au PMA et à l'EGF sont capables d'induire une augmentation significative de la phosphorylation de MDM2 par rapport aux cellules non traitées. Les cellules traitées au PMA présentent une augmentation importante de la phosphorylation de MDM2 par rapport au traitement à l'EGF (Figure 6A). Ceci s'explique par le fait que l'EGF induit une réponse rapide et transitoire due à la mise en place des mécanismes de régulation. Afin d'observer ce phénomène, nous avons effectué une étude cinétique en stimulant les cellules HEK293 avec de l'EGF et du PMA de 2 minutes à 60 minutes. Lors d'une stimulation à l'EGF, nous observons après deux minutes une forte augmentation de la phosphorylation de MDM2 en comparaison à la condition non stimulée. Cependant, une diminution du signal de phosphorylation est corrélée avec le temps de stimulation (Figure 6B). Ceci est dû à la mise en place d'une boucle de régulation de la voie MAPK ayant pour effet de maintenir une activité transitoire de la voie MAPK après une stimulation par des facteurs de croissance. Lors d'une stimulation avec le PMA, nous constatons une phosphorylation intense conservée dans le temps (Figure 6D). Afin de s'assurer que la phosphorylation observée est bien spécifique à l'activité de la voie MAPK et non de la voie PI3K, nous avons pré-traité les cellules HEK293 avec des inhibiteurs de la voie PI3K (Wortmaninn inhibiteur de PI3K et PI-103 inhibiteur de PI3K et mTOR). Par la suite, nous avons stimulé la voie MAPK avec de l'EGF. L'efficacité des inhibiteurs est contrôlée par une

absence de phosphorylation sur Akt. Nous constatons une faible diminution de la phosphorylation de MDM2 en présence des inhibiteurs de la voie PI3K, suggérant que la kinase Akt, faisant partie de la voie PI3K, phosphoryle MDM2 (Figure 6C). La voie MAPK induit spécifiquement la phosphorylation de MDM2 donc la voie PI3K n'est pas exclusivement responsable de la phosphorylation de MDM2 sur la Ser166. Nous pouvons donc en conclure que la stimulation par PMA et l'EGF va activer une protéine kinase qui induit la phosphorylation de MDM2 en Ser166.



**Figure 6 La voie MAPK induit une phosphorylation de MDM2 en Ser166**

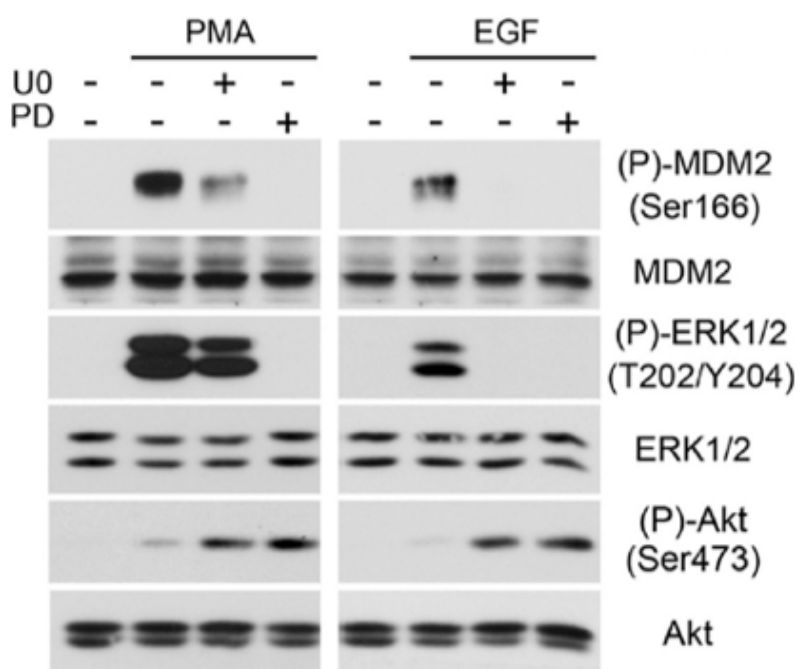


Les cellules HEK293 ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis stimulées pendant 10-20 min avec des agonistes qui activent préférentiellement la voie MAPK (PMA, EGF et sérum) ou la voie PI3K (insuline, sérum). Les cellules ont été récoltées puis nous avons observé la phosphorylation de MDM2 à l'aide d'un anticorps phospho-motif par western blot (A). Nous avons effectué une étude cinétique avec l'EGF afin d'observer la cinétique de phosphorylation de MDM2 après stimulation par ce facteur de croissance (B). Nous avons corrélé spécifiquement la phosphorylation de MDM2 en Ser166 avec l'activité de la MAPK en inhibant la voie PI3K à l'aide des inhibiteurs PI-103 et wortmannin puis en activant la voie avec de l'EGF pendant 10min (C). Nous avons effectué une étude cinétique avec du PMA afin d'observer la cinétique de phosphorylation de MDM2 après stimulation (D). Figures générées par Julie Moreau.

## II. La phosphorylation de MDM2 par la voie MAPK est dépendante de MEK et RSK

Afin d'identifier la kinase responsable de la phosphorylation de MDM2, nous utilisons des inhibiteurs spécifiques dirigés contre les principales kinases de la voie Ras/MAPK. Dans un premier temps, nous allons observer l'effet des kinases MEK1/2 sur la phosphorylation de MDM2 en Ser166. Pour cela, nous exposons les cellules HEK293 en présence de deux inhibiteurs spécifiques de MEK1/2 (PD184352 et UO126) et par la suite, nous stimulons la voie MAPK avec du PMA et de l'EGF. Une absence de phosphorylation sur les kinases ERK1/2, cible directe des kinases MEK1/2 dans la cascade d'activation de la voie MAPK, nous permet de contrôler l'efficacité des inhibiteurs utilisés. Lorsque les cellules sont en présence des inhibiteurs de MEK1/2, nous observons une quasi totale inhibition de la phosphorylation de MDM2. La phosphorylation résiduelle de MDM2 en présence de U0126 peut être expliquée par le manque d'efficacité de l'inhibiteur en présence de PMA. En effet, l'activité de ERK1/2 n'est pas totalement inhibée se traduisant par la présence de phospho-ERK1/2 en présence de U0126. Cependant, les cellules traitées avec le PD184352 et stimulées avec du PMA et de l'EGF présentent une totale absence de phosphorylation de MDM2. Fait intéressant, lorsque l'on inhibe la voie MAPK, nous observons une augmentation de l'activité de la voie PI3K qui se traduit par la présence de phospho-Akt. Nous pouvons donc conclure que la phosphorylation de MDM2 par la voie MAPK est dépendante de MEK1/2 ainsi la kinase qui phosphoryle MDM2 en Ser166 se situe en aval des kinases MEK1/2 (Figure 7). D'après les publications précédentes, la kinase Akt phosphoryle

MDM2 sur les sérines 166 et 186. Sachant que la séquence présente aux abords de la Ser166 correspond au motif de phosphorylation des kinases AGC, nous allons inhiber une kinase de cette famille agissant en aval de MEK1/2 : la protéine kinase RSK. Dans un premier temps, nous entreprenons d'effectuer une analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de MDM2. Cette étude nous révèle que la séquence aux abords des sérines 166 et 186 de MDM2 possède un motif de phosphorylation hautement conservé chez les vertébrés reconnus par RSK (RXRXXpS/T).



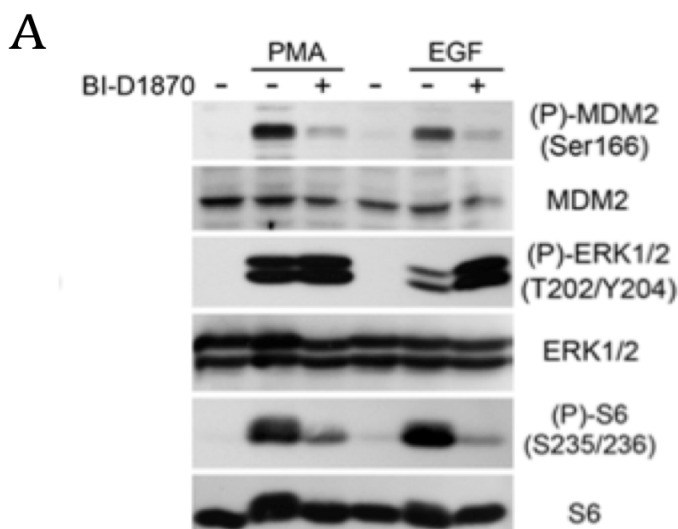
**Figure 7 La phosphorylation de MDM2 en Ser166 est dépendante de MEK1/2**

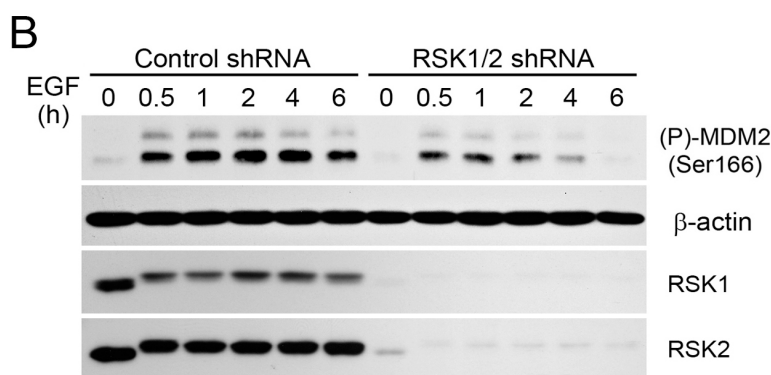
Les cellules HEK293 ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis pré-traitées pendant 30 min avec des inhibiteurs spécifiques de MEK1/2 : le U0126 et le PD184352. Nous avons par la suite stimulé les cellules avec des agonistes de la voie MAPK, PMA (25 ng/ml; 20 min) ou EGF (25 ng/ml; 10 min). La phosphorylation de MDM2 a été détectée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-phospho Ser 166. Figure générée par Julie Moreau.

Nous avons donc pré-traité les cellules HEK293 avec un inhibiteur de RSK, le BI-D1870, puis stimulé les cellules avec du PMA et de l'EGF. En présence de cet inhibiteur, nous observons une forte diminution de la phosphorylation de MDM2 sur la Ser166. Afin de vérifier l'efficacité de l'inhibiteur

de RSK, nous avons contrôlé le niveau de phosphorylation d'un substrat direct de RSK, la protéine S6 (Figure 8A).

Afin de s'assurer que l'effet obtenu avec l'inhibiteur de RSK n'est pas dû à un effet non spécifique, nous avons inhibé RSK1/2 dans les cellules HEK293 par l'intermédiaire des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA). Pour cela, nous avons mis les cellules HEK293 en présence de particules lentivirales comportant un shRNA dirigé contre RSK1/2 et un shRNA contrôle qui n'a aucune cible. Les cellules exprimant le shRNA RSK1/2 sont déplétées partiellement pour l'expression de RSK1 et RSK2. Ces cellules ont été mises en présence du facteur de croissance EGF pendant un temps croissant de 0 à 6h afin de moduler la phosphorylation de MDM2. La stimulation des cellules exprimant le shRNA contrôle, montre une forte phosphorylation de MDM2 au cours du temps, tandis que les cellules exprimant le shRNA RSK1/2 montrent une faible phosphorylation de MDM2. Ce dernier résultat peut être expliqué par la présence des protéines RSK1/2 résiduelles. Cependant, nous pouvons constater une décroissance rapide de la phosphorylation de MDM2 après 2h de stimulation (Figure 8B). Cette observation montre l'importance des kinases RSK1/2 sur le niveau de phosphorylation de MDM2. Nous pouvons donc conclure que le niveau de phosphorylation de MDM2 requiert l'activation de la kinase RSK.





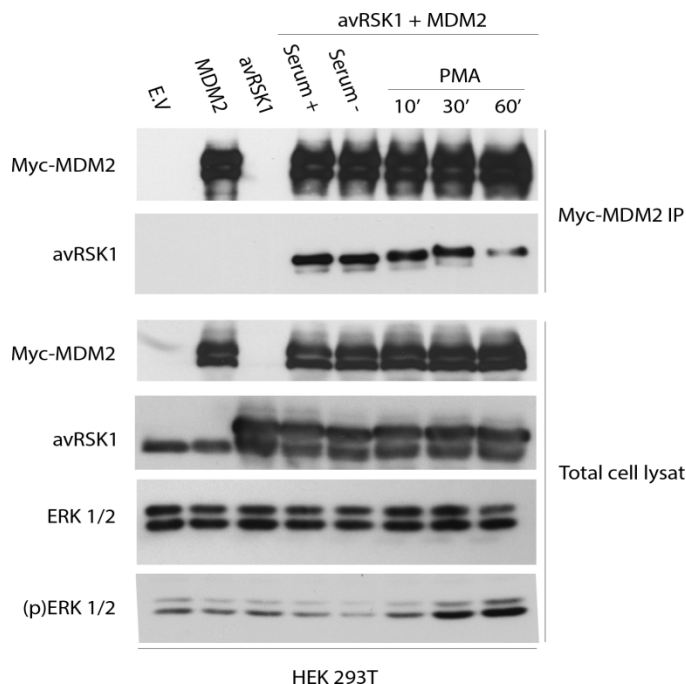
**Figure 8 La phosphorylation de MDM2 est corrélée avec le niveau d'activité de RSK**

Les cellules HEK293 ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis pré-traitées pendant 30 min avec un inhibiteur spécifique de RSK, le BI-D1870. Nous avons par la suite stimulé les cellules avec des agonistes de la voie MAPK : PMA (25 ng/ml; 20 min) ou EGF (25 ng/ml; 10 min). Les temps d'exposition aux agonistes de la voie MAPK ont été choisis en fonction des observations faites dans la figure 6 b et D. En effet, ces temps ont montré une phosphorylation optimum de MDM2. La phosphorylation de MDM2 a été détectée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-phospho Ser 166 (A). Les cellules HEK293 exprimant un shRNA ciblant spécifiquement les ARNm de RSK1 et RSK2. Les cellules après sélection ont été stimulées lors d'une cinétique avec le facteur de croissance EGF pendant 6h (B). Figures générées par Julie Moreau.

### III. MDM2 est un substrat direct de RSK

Afin de démontrer que MDM2 est un substrat direct de RSK, nous avons, dans un premier temps, cherché à observer une interaction physique entre la kinase RSK et son substrat MDM2. Pour cela, nous avons étudié la présence d'un complexe entre MDM2 et RSK selon différentes conditions de transfection au sein des cellules HEK293 : MDM2 seul, MDM2 et RSK sauvage WT. Afin de savoir si l'interaction entre les deux protéines peut être modulable, nous avons déprivé les cellules de sérum pendant 16h puis stimulé la voie MAPK avec du sérum ou du PMA suivant une cinétique de 10 minutes à 1h. Nous avons par la suite immunoprécipité MDM2 par l'intermédiaire de son marquage myc. A la suite de cette expérience, nous avons pu constater que MDM2 interagit physiquement avec RSK. En effet lors de la co-expression de MDM2 et RSK1, nous remarquons la présence de RSK1 après l'immunoprécipitation de MDM2. L'absence de la protéine RSK1 lors de la seule expression de

ce dernier nous permet de valider la spécificité de nos observations. De plus, l'interaction entre ces deux protéines semble être constitutive car aucune modulation n'a été observée lors de la stimulation avec le sérum ou le PMA. Ceci nous permet de conclure qu'en condition de surexpression RSK et MDM2 font partie d'un même complexe protéique. Il serait intéressant de connaître si l'interaction entre MDM2 et RSK est directe ou indirecte (Figure 9).

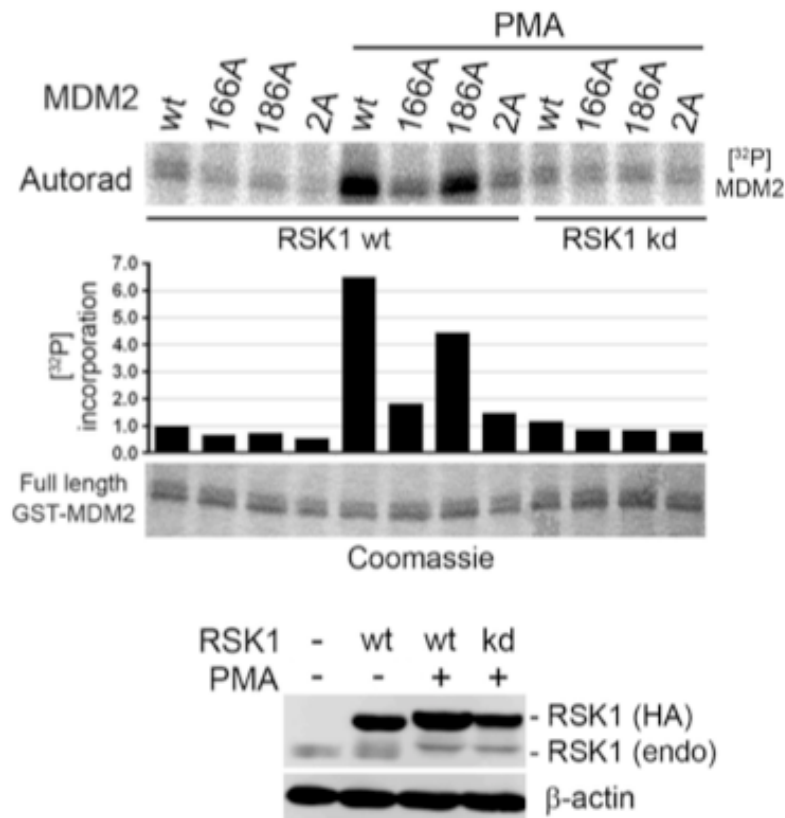


**Figure 9 Présence d'un complexe entre la kinase RSK et MDM2**

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec la forme aviaire de la kinase RSK1 (avRSK1) et la forme humaine marquée myc de MDM2 (myc-MDM2). Ces cellules ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis stimulées avec du sérum ou du PMA pendant 10 à 60 min. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps anti-myc a été effectuée. Enfin la protéine a été révélée par western blot.

Afin de confirmer que MDM2 est un substrat direct de RSK, nous entreprenons d'effectuer un essai kinase *in vitro*. Pour cela, nous utilisons différents mutants non-phosphorylables en Ser166 et/ou 186 (substitution des sérines en alanines). Les différents mutants non-phosphorylables ont été générés dans les bactéries: GST-MDM2 S166A, MDM2 S186A et MDM2 S166/186A. Ces mutants ont été mis en présence d'une forme sauvage ou d'une forme inactive de RSK1 purifiée (sauvage WT ou inactive kinase KD). Les différentes formes de RSK1 ont été purifiées à partir de cellules HEK293 traitées ou

non avec du PMA. Nous observons une forte incorporation de phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ) provenant de MDM2 en présence de RSK1 WT stimulée avec du PMA. Cette observation nous permet d'une part de valider notre expérience *in vitro* et d'affirmer que MDM2 est un substrat direct de RSK1. Afin de confirmer cette observation, nous constatons une absence d'incorporation dans le mutant MDM2 S166A, nous permettant ainsi de confirmer que la kinase RSK phosphoryle directement la sérine 166. Le mutant de MDM2 S186A présente une incorporation résiduelle de  $^{32}\text{P}$ , cette observation peut être expliquée par une différence d'affinité entre les Ser166 et Ser186. RSK semble donc préférentiellement phosphoryler la Ser166. Lorsque l'on observe le mutant MDM2 S2A (non phosphorylable), on ne constate aucune incorporation de  $^{32}\text{P}$ . Ceci, nous permet de conclure que RSK1 a pour cible unique et directe *in vitro* les sites de phosphorylation Ser166 et Ser186 de MDM2. Enfin, en présence d'une forme inactive de RSK1, nous n'observons aucune incorporation de  $^{32}\text{P}$ , nous permettant de conclure que la phosphorylation de MDM2 sur les Ser166 et Ser186 est dépendante de l'activité kinase de RSK (Figure 10).



**Figure 10 MDM2 est un substrat direct de RSK**

Afin de valider que MDM2 est directement phosphorylée par RSK, un essai kinase a été effectué sur les sérines 166 et 186. Différents mutants non-phosphorylables ont été générés dans les bactéries: GST-MDM2 S166A, MDM2 S186A et MDM2 S166/186A. Ces mutants ont été utilisés lors de l'essai kinase en présence de RSK1 purifiée (sauvage WT ou inactive kinase KD) à partir de cellules HEK293 stimulées ou non avec du PMA. Figure générée par Julie Moreau et Philippe ROUX.

Nous pouvons donc conclure que les sites de phosphorylation Ser166/186 sont les cibles uniques et directes de RSK.

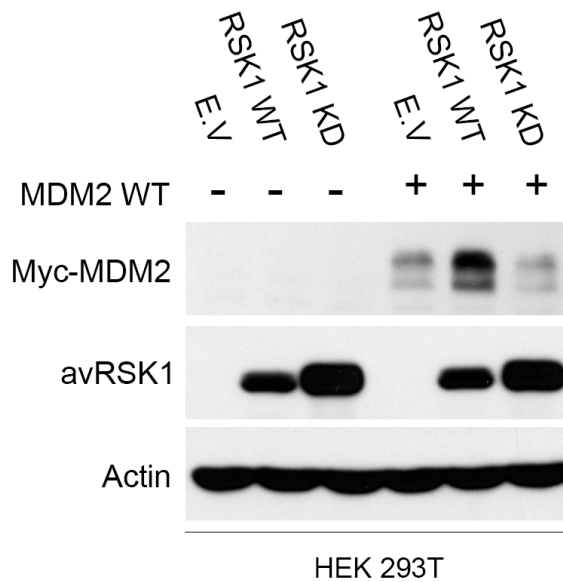
#### IV. RSK favorise l'accumulation protéique de MDM2

Des études antérieures suggèrent que la phosphorylation de MDM2 sur les Ser166 et 186 par la kinase Akt joue un rôle sur la stabilité de la protéine. La phosphorylation en Ser166 et 186 réduit son

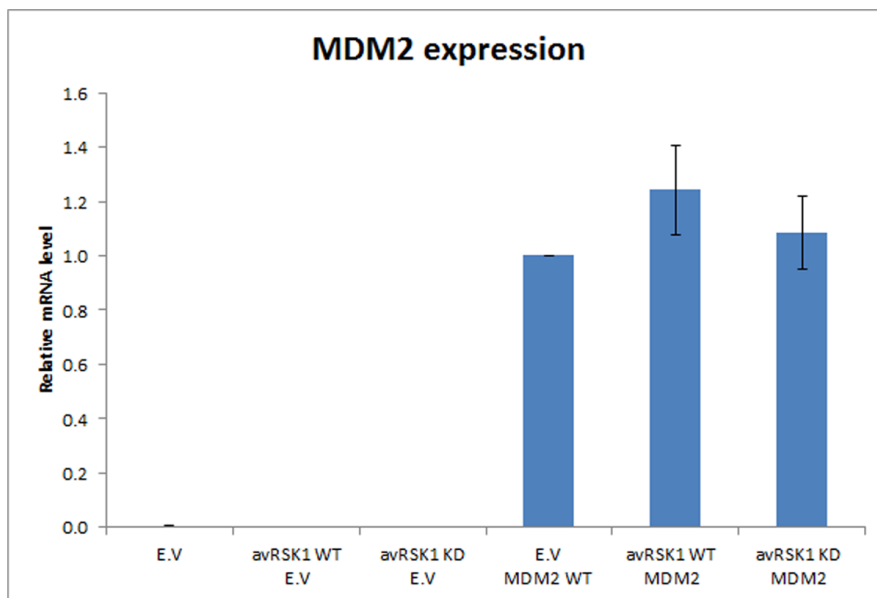
ubiquitination donc diminue sa dégradation via le protéasome (Feng et al., 2004; Ogawara et al., 2002).

La kinase RSK phosphoryle les mêmes sites que Akt ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que RSK joue un rôle important sur la stabilité de MDM2. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons observé l'abondance protéique de MDM2 dans différentes conditions de transfection au sein des cellules HEK293 : MDM2 seul, MDM2 et RSK sauvage WT, MDM2 et RSK inactive kinase KD.

Nous avons pu constater que le niveau protéique de MDM2 était plus abondant en présence de la forme sauvage de RSK1 par rapport à la forme inactive kinase (KD) et MDM2 seule (Figure 11 A).







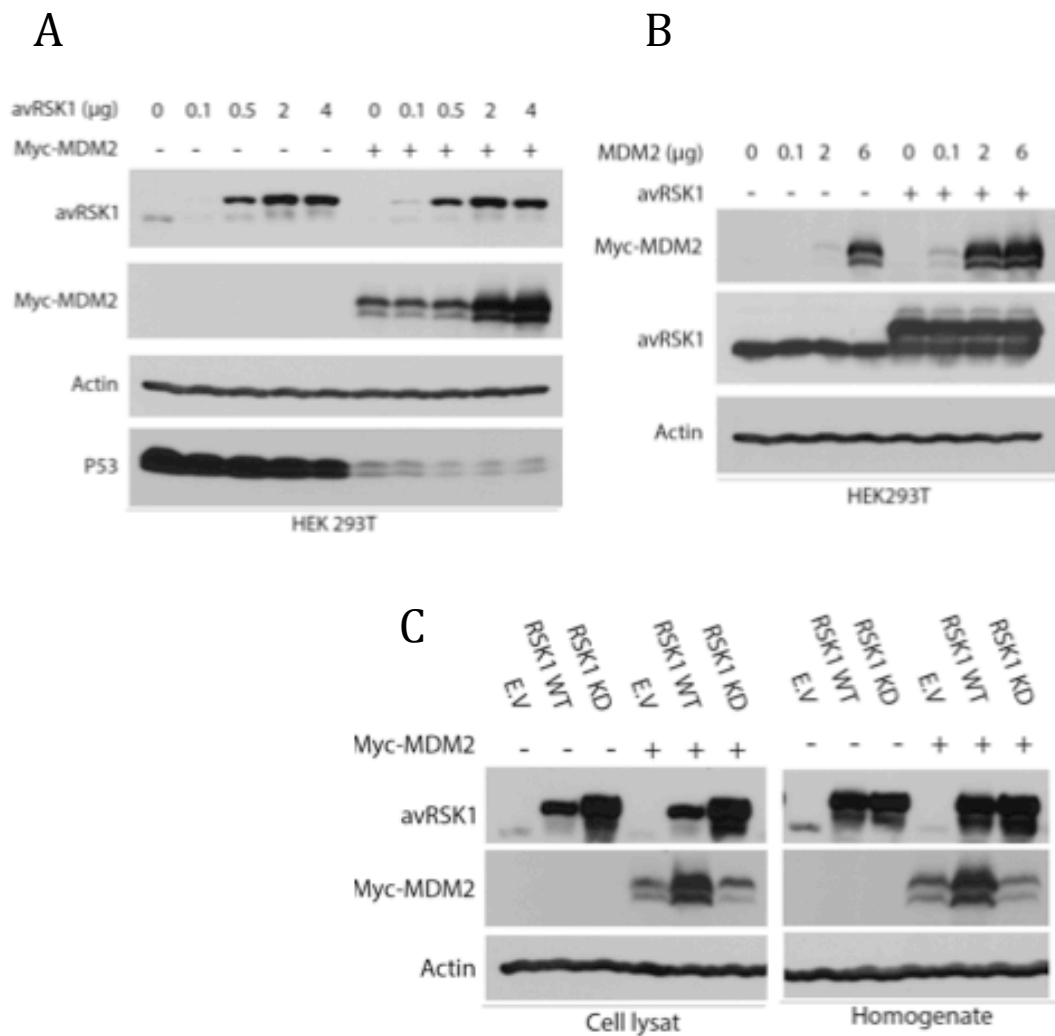
**Figure 11 Le niveau protéique de MDM2 est dépendant de l'activité de RSK**

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec les constructions plasmidiques: RSK WT (sauvage) ou KD (inactive kinase) en présence de la forme WT de MDM2. L'abondance des protéines a été observée par western blot (A). Une analyse qPCR sur le transcrit de MDM2 a été effectuée dans les mêmes conditions que (A), (B).

Afin de connaître l'origine de l'accumulation de MDM2 en présence de la forme RSK WT, nous avons entrepris une étude qPCR sur le gène MDM2 dans les mêmes conditions de l'expérience ci-dessus. Une faible augmentation du transcrit de MDM2 a été constatée en présence de RSK1 WT. Cependant, cette augmentation ne peut probablement pas, à elle seule, expliquer l'abondance protéique de MDM2 (Figure 11B).

Nous avons réalisé différentes expériences afin de mieux caractériser l'abondance protéique de MDM2 en fonction du niveau d'activité de RSK. Pour cela, nous avons transfecté différentes quantités de RSK1 sauvage en présence d'une quantité constante de MDM2. Nous pouvons constater que l'abondance de MDM2 croît en fonction de la quantité de RSK. Le niveau protéique de MDM2 est dépendant de la quantité de RSK transfectée (Figure 12A). Nous avons par la suite transfecté

différentes quantités de MDM2 WT en présence d'une quantité constante de RSK WT. La surexpression de RSK nous permet de détecter la protéine MDM2 plus efficacement par western blot. En effet, en l'absence d'une surexpression de RSK1 nous détectons la protéine MDM2 transfectée vers 2  $\mu$ g tandis qu'en présence d'une surexpression de RSK1, nous détectons la protéine MDM2 transfectée vers 0.1 $\mu$ g. Ces expériences permettent de conclure que le niveau protéique de MDM2 est dépendant de la quantité de RSK (Figure 12B). RSK doit jouer un important rôle dans l'abondance protéique de MDM2. Des études récentes montrent que les sites de phosphorylation Ser166 et 186 sont à l'origine de la translocation de la protéine du cytoplasme au noyau. Nous avons donc comparé le niveau de MDM2 dans le lysat cellulaire (partie soluble d'une cellule) et dans l'homogénat (ensemble des constituants cellulaires) en présence de RSK sauvage et inactive kinase. Or, nous n'observons aucune différence de niveau protéique dans les différentes conditions entre le lysat et l'homogénat. Cette observation permet de conclure que la kinase RSK induit une accumulation de MDM2 dans l'homogénat et le lysat cellulaire (Figure 12C).



**Figure 12 RSK régule la quantité protéique de MDM2**

Les cellules HEK293T ont été cultivées en présence de sérum pour chacune des expériences. Les cellules ont été co-transfectées avec une quantité croissante de RSK1 de 0 à 4 μg et une quantité fixe de MDM2 WT (A). Les cellules ont été co-transfectées avec une quantité croissante de MDM2 de 0 à 6 μg et une quantité fixe de RSK1 (B). Les cellules ont été transfectées avec différentes formes de RSK1 (WT et KD) en présence de MDM2 WT. Une fraction de la lyse totale des cellules (homogénat) et une fraction de la lyse après purification par centrifugation (lysate) ont été étudiées par western blot (C).

## V. La phosphorylation de MDM2 sur les Ser166/186 régule l'ubiquitination et la stabilité de la protéine

L'ubiquitine ligase MDM2 est une protéine très instable qui est dégradée par le protéasome. Afin de connaître si les sites de phosphorylation Ser166 et 186 jouent un rôle dans la stabilité de la protéine, nous avons co-transfecté MDM2 avec différentes constructions de RSK sauvage et inactive kinase. Puis nous traitons, lors d'une cinétique de 0 à 6h, les cellules avec un inhibiteur qui bloque la synthèse protéique, la cycloheximide. Nous observons en présence de RSK WT une augmentation de la stabilité de MDM2 par rapport aux conditions sans RSK et avec RSK KD. Après avoir quantifié les bandes de trois expériences de stabilité de MDM2, nous pouvons constater que la demi-vie de la protéine MDM2 est doublée en présence d'une forte activité de RSK. L'activité de RSK induit donc une augmentation de la stabilité de MDM2. Nous pouvons conclure que MDM2 est deux fois plus stable en présence d'une forte activité de RSK (Figure 13).

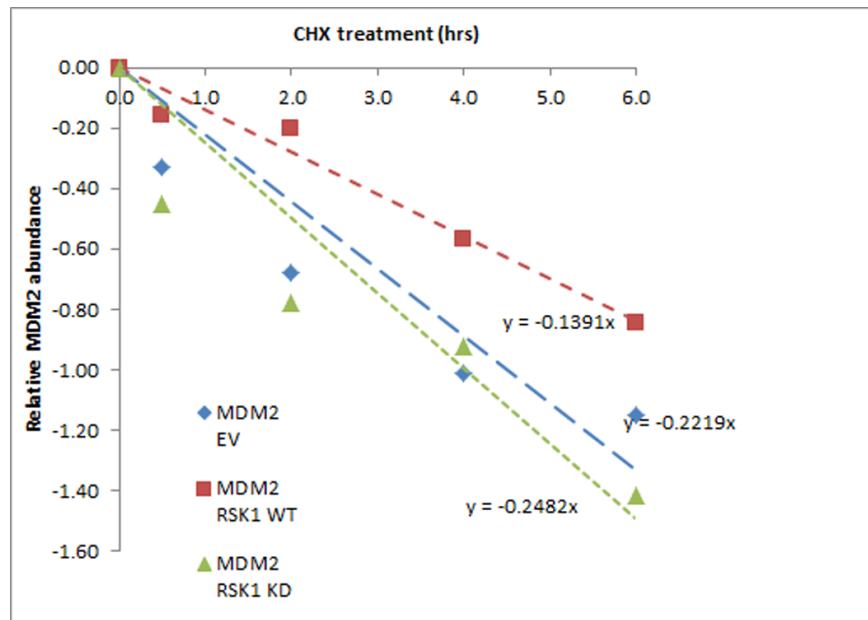
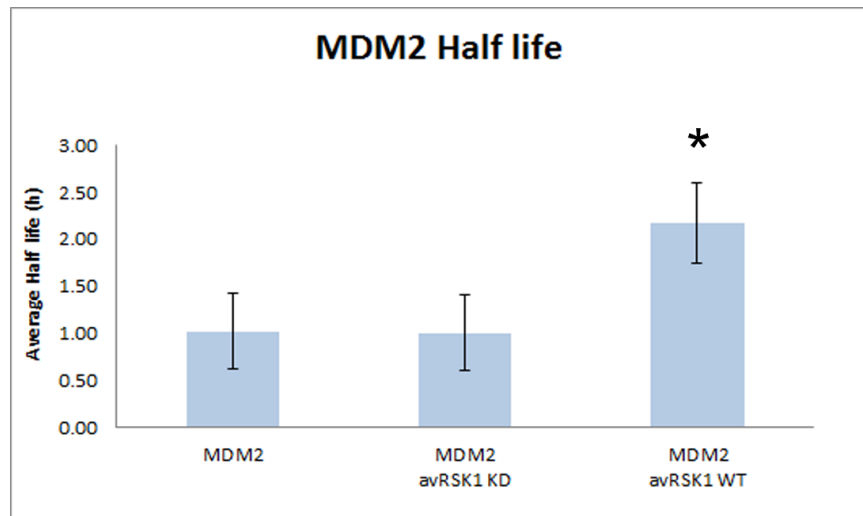
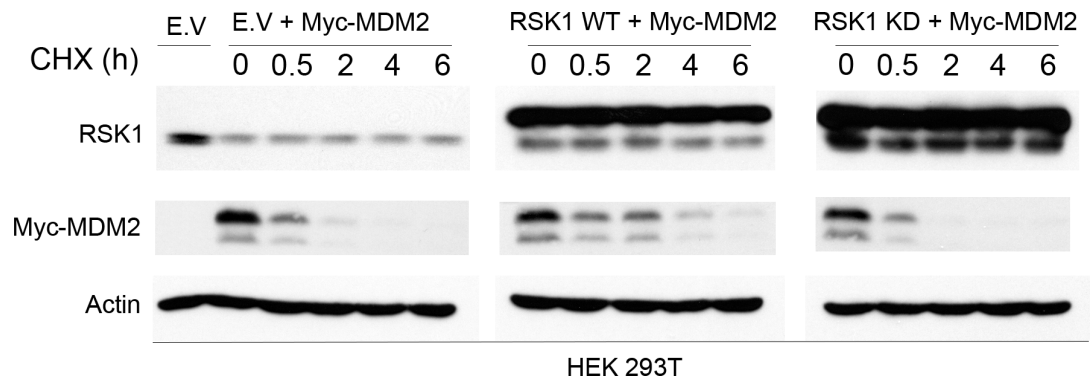
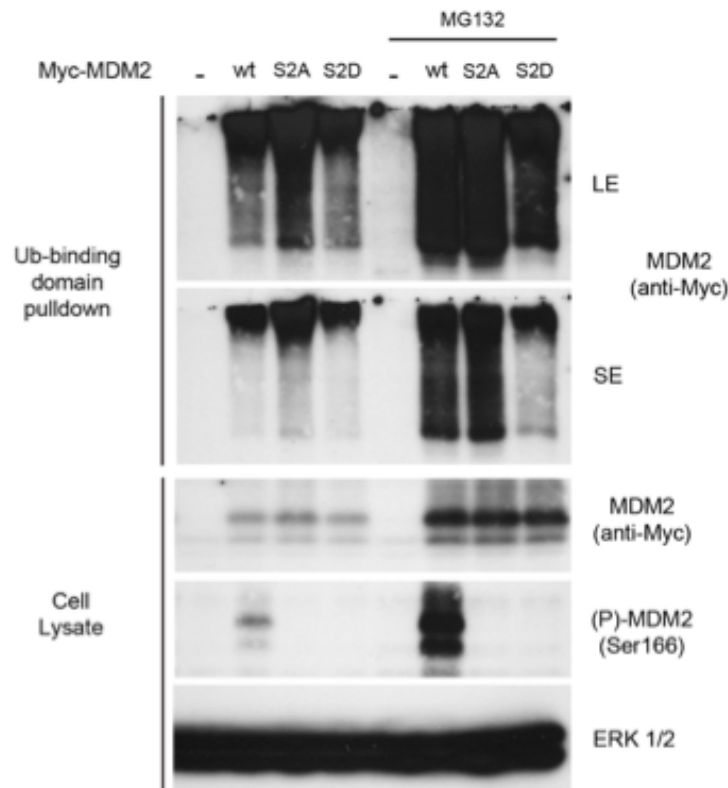


Figure 13 RSK semble agir positivement sur la stabilité de MDM2

Les cellules HEK293 ont été cultivées avec du sérum et transfectées avec la forme aviaire de RSK1 et/ou la forme humaine de MDM2. Ces cellules ont été traitées avec un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide (100 µg/ml) lors d'une cinétique de 0 à 6h. L'abondance protéique de MDM2 a été observée par western blot puis les bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel informatique FUJI Multi Gauge V3.

Afin de déterminer si les sites de phosphorylation influencent la capacité de MDM2 à s'auto-ubiquitiner et donc à induire sa dégradation via le protéasome, nous avons utilisé la technologie appelée Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBE). TUBE est composée de domaines associés à l'ubiquitine (UBA) qui possèdent une forte affinité pour l'ubiquitine. Cette technique a été développée pour isoler et identifier les protéines ubiquitinées. TUBE montre une forte affinité avec les complexes de poly-ubiquitination (Hjerpe et al., 2009). A l'aide de cette méthode, nous avons comparé le profil d'ubiquitination des différents mutants de MDM2 : la forme sauvage (WT), la forme non phosphorylable (S2A) et la forme phosphomimétique (S2D). Cette méthode nous a permis de démontrer une augmentation de l'ubiquitination basale du mutant MDM2 S2A comparé au MDM2 WT. En effet le niveau basal d'ubiquitination de MDM2 S2A est supérieur au taux d'ubiquitination des formes WT et S2D. De plus, lorsque les cellules sont traitées avec du MG132 (inhibiteur du protéasome) nous constatons que le niveau d'ubiquitination de la forme S2D est plus faible qu'en présence des formes WT et S2A (Figure 14). Ces observations nous permettent de conclure que les sites de phosphorylation Ser166/186 jouent un rôle important dans l'ubiquitination de MDM2.

A la suite de ces expériences, nous avons cherché à vérifier si les différences d'ubiquitination observées avec les mutants de MDM2 pouvaient être corrélés avec un changement de stabilité protéique. Nous avons donc effectué un essai de stabilité en présence de Cycloheximides sur des cellules HEK293T transfectées avec les mutants de MDM2 (S2A et S2D) et la forme sauvage (WT). Nous n'avons pas été en mesure d'observer des changements significatifs de la stabilité entre les différentes de MDM2 (données non montrées).



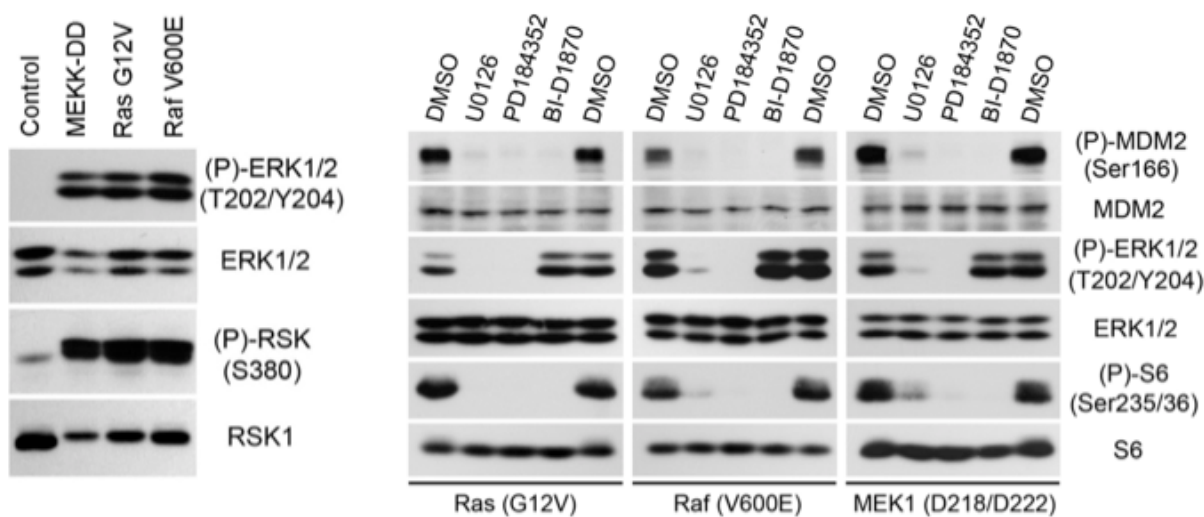
**Figure 14 Les Ser166 et 186 agissent sur le poly-ubiquitination de MDM2**

Le profil de polyubiquitination de MDM2 a été observé par la méthode Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBE). Les constructions de MDM2 (MDM2 S2A, MDM2 S2D et MDM2 WT) ont été exprimées dans des cellules HEK293. Dans ces mêmes conditions, les cellules ont été traitées avec un inhibiteur du protéasome le MG132 à 10 $\mu$ M. Figure générée par Patrick Lacasse.

## VI. Les mutations oncogéniques de la voie MAPK induisent une phosphorylation constitutive de MDM2.

Nous avons démontré précédemment que MDM2 est un substrat direct de RSK, dans cette partie nous allons démontrer l'impact des mutations oncogéniques de la voie MAPK sur la phosphorylation de MDM2. Il est important de savoir que l'ensemble des mutations activatrices de la voie MAPK vont induire une augmentation de l'activité de ERK1/2 et donc de RSK. Nous avons généré trois lignées cellulaires stables de HEK293 qui contiennent les mutations activatrices de la voie de MAPK ; MEK1 (D218/D222), B-Raf (V600E) et H-Ras (G12V). L'ensemble de ces cellules montrent une activité constitutive de ERK1/2 et de RSK en comparaison à la lignée cellulaire contrôle, déprivée de facteurs

de croissance. Ces trois lignées cellulaires montrent également un haut niveau de phosphorylation de MDM2 qui peut être inhibé à l'aide de différents inhibiteurs ciblant spécifiquement des acteurs de la voie MAPK comme MEK1/2 (U0126 et PD184352) et RSK (BI-D1870) (Figure 15). Afin de contrôler l'efficacité de chaque inhibiteur, nous avons corrélé l'inhibition de MEK1/2 avec une diminution de phosphorylation sur ERK1/2 et l'inhibition de RSK avec une diminution de phosphorylation sur la protéine S6. Ces expériences nous permettent de conclure sur le rôle que des mutations oncogéniques de la voie MAPK occupent sur l'activation constitutive de MDM2. De plus, la phosphorylation constatée sur MDM2 est également dépendante de RSK.



**Figure 15 Les mutations oncogéniques de la voie MAPK favorisent la phosphorylation de MDM2**

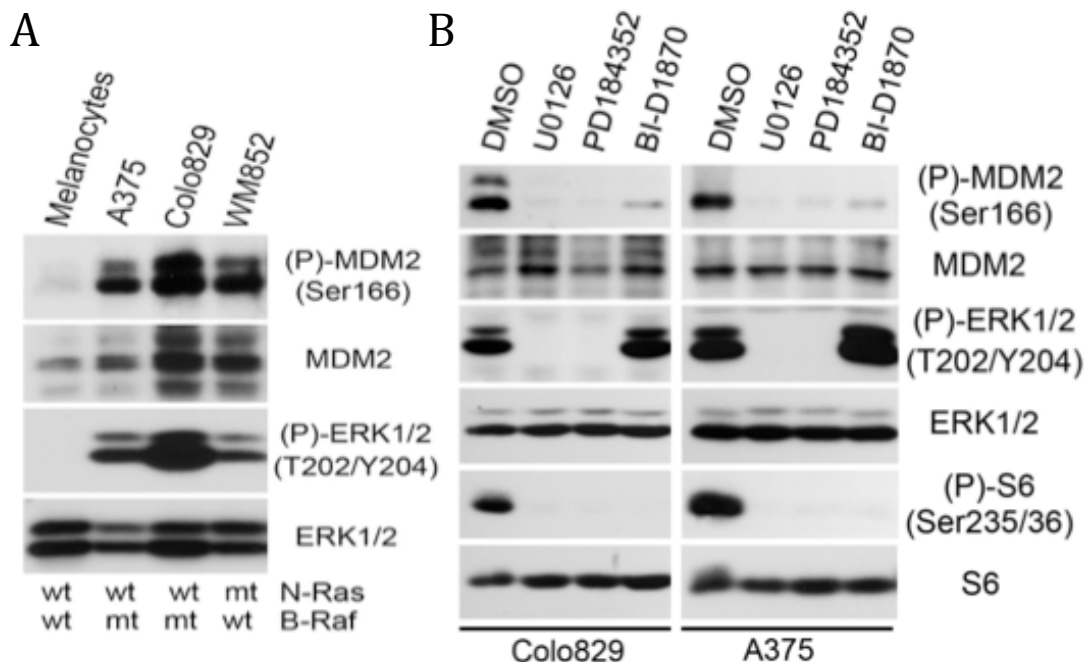
Les cellules HEK293 exprimant de façon stable les formes oncogéniques H-Ras (G12V), B-Raf (V600E) ou MEK1 (S218/S22D) ont été cultivées pendant 12h sans sérum (A). De façon similaire à (A), les cellules ont été traitées avec des inhibiteurs de MEK1/2 (U0126, PD184352) ou RSK (BI-D1870) pendant 30 min (B). Figures générées par Julie Moreau.

## VII. MDM2 est constitutivement phosphorylée dans les mélanomes présentant une mutation oncogénique dans la voie MAPK

Les mutations oncogéniques aboutissant à une activité constitutive de la voie MAPK sont précoces dans le développement du mélanome. Une majorité des mélanomes présente une mutation B-Raf



V600E. Les cellules de mélanomes sont donc un excellent modèle pour étudier l'impact de la voie MAPK sur la phosphorylation de MDM2 et sur le rôle biologique de ces phosphorylations. Pour cette étude, nous allons utiliser trois lignées cellulaires cancéreuses; les A375 et Colo829 porteurs de la mutation B-Raf V600E et la lignée WM852 porteuse d'une mutation N-Ras Q61R. Une lignée normale de mélanocytes seront utilisés comme contrôle. Les trois lignées cancéreuses montrent une phosphorylation constitutive de MDM2 en Ser166 en comparaison avec les mélanocytes (Figure 16A). Au sein des cellules cancéreuses A375 et Colo829, nous modulons négativement la phosphorylation de MDM2 en utilisant des inhibiteurs spécifiques de MEK1/2 (U0126 et PD184352) et de RSK (BI-D1870) (Figure 16B). L'activation de la voie MAPK est contrôlée par les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 et S6. Nous avons démontré la phosphorylation constitutive de MDM2 dans des cellules cancéreuses de mélanome présentant des mutations oncogéniques de la voie MAPK. La modulation du niveau de phosphorylation de MDM2 par des inhibiteurs de la voie MAPK nous permet de conclure que la phosphorylation en Ser166 de MDM2 est hautement dépendante du niveau d'activation de la voie de signalisation MAPK.



**Figure 16 Les mélanomes montrent une phosphorylation constitutive de MDM2 en Ser166**

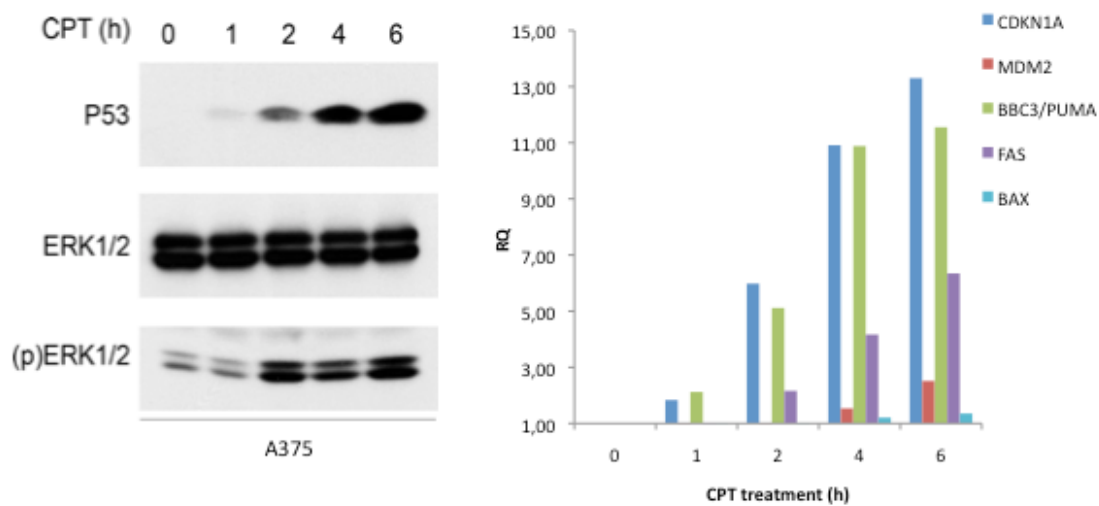
Les mélanocytes normaux et les cellules de mélanomes ont été cultivés en sérum pendant 12h. La phosphorylation de MDM2 a été observée à l'aide d'un anticorps phospho-motif dirigé contre la Ser166 (A). Les cellules de mélanomes portant une mutation B-Raf (V600E) ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis traitées avec des inhibiteurs de MEK1/2 (U0126 ou PD184352) et RSK (BI-D1870) pendant 60 minutes (B). Figures générées par Julie Moreau.

## VIII. L'inhibition de RSK augmente le niveau protéique de p53 suite à un dommage à l'ADN dans les mélanomes.

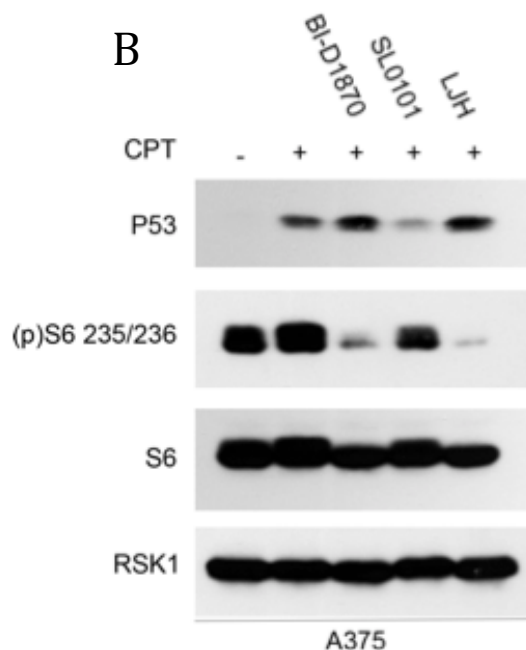
L'ubiquitine ligase MDM2 joue un rôle important dans la régulation du niveau protéique de p53. Nous avons démontré que la phosphorylation en Ser166 et 186 favorise la stabilité de MDM2. Nous émettons l'hypothèse que la voie MAPK affecte le niveau protéique de p53 via la phosphorylation constitutive de MDM2 dans les cellules de mélanomes. Les niveaux protéiques et l'activation de p53 sont stimulés lors d'un stress cellulaire comme par exemple en présence de dommage à l'ADN.

Nous avons donc par la suite observé l'impact d'un dommage à l'ADN sur le niveau endogène de p53 en présence ou non de différents inhibiteurs de la voie MAPK dans les cellules de mélanomes. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de la topoisomérase I : la camptothécine, qui va induire des cassures doubles brins dans l'ADN (Grivicich et al., 2001). Nous avons évalué, à l'aide d'une cinétique, la capacité du traitement à induire une accumulation de p53 dans les cellules A375. Nous avons pu constater qu'une très faible quantité de camptothécine induit une accumulation détectable de p53 à partir de 2h de traitement (Figure 17A). Par la suite, nous avons simultanément traité les cellules A375 avec de la camptothécine et différents inhibiteurs de RSK. Nous avons pu observer une faible augmentation du niveau protéique de p53 en présence des inhibiteurs de RSK par rapport à une condition contrôle traitée seulement avec la camptothécine (Figure 17B). Nous pouvons donc en conclure que RSK a un impact sur le niveau protéique de p53 dans les cellules de mélanomes. Nous pouvons également spéculer que la modulation du niveau protéique de p53 en présence des inhibiteurs de RSK est probablement dépendante du niveau protéique ou de l'activité de MDM2.

A



B



**Figure 17 Les inhibiteurs de RSK semblent augmenter le niveau protéique de p53 lors d'un dommage à l'ADN**

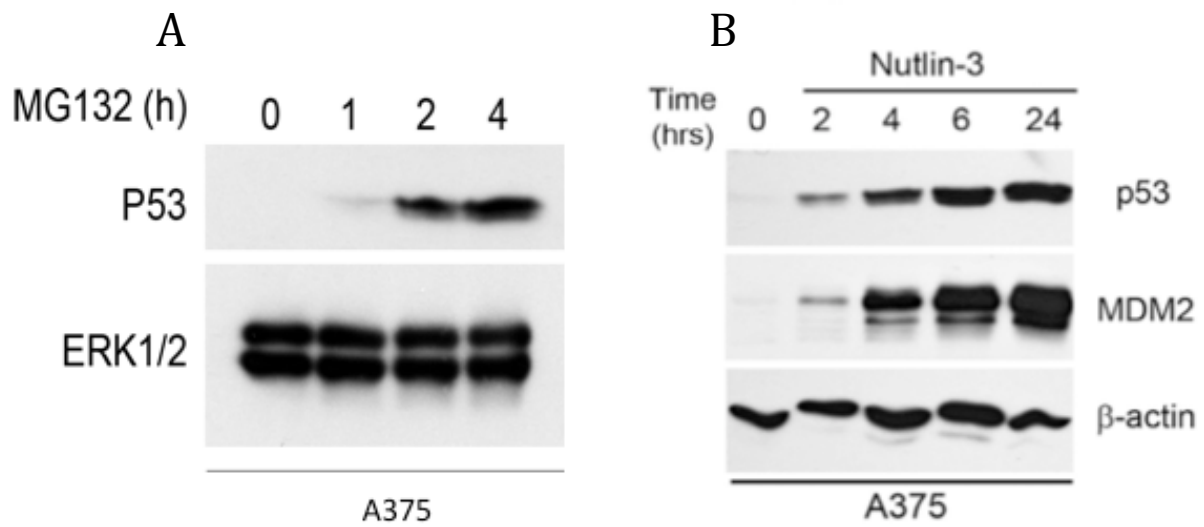
Les cellules de mélanomes A375 ont été cultivées en sérum pendant 12h. Un dommage à l'ADN double brin a été effectué en présence d'un inhibiteur de la topoisomérase I, la camptothécine (CPT). Le niveau protéique de p53 et l'induction de ses gènes cibles ont été observés lors d'une cinétique de 6h par western blot et qPCR. Les résultats de qPCR ont été normalisés avec le gène GAPDH et établi en fonction d'un contrôle sans traitement à la camptothécine(A). Les cellules de mélanomes A375 ont été cultivées en sérum pendant 12h puis en présence de camptothécine et d'inhibiteur de RSK (BI-D1870, SL0101 et le LJH) pendant 2h. Le niveau de p53 a été révélé par western blot (B). Au cours de

ces expériences, le niveau endogène de MDM2 n'a pas pu être mesuré. Les expériences pourront être répétées et optimisées afin d'observer le niveau de la protéine MDM2.

## **IX. Le niveau protéique de p53 dans les mélanomes est dépendant de MDM2 et du protéasome**

Dans des conditions non stressées, les cellules gardent le niveau protéique de p53 bas. L'E3 ubiquitine ligase MDM2 a pour rôle d'ubiquitiner p53 afin d'induire sa dégradation via le protéasome. (Levine, 1997; Wu and Levine, 1997). Ce processus de régulation de p53 est dépendant de sa liaison avec MDM2 sur sa partie N-terminale. La Nutlin est une petite molécule qui inhibe la liaison entre MDM2 et p53 (Tovar et al., 2006; Vassilev, 2004). Cette molécule a été très étudiée car elle induit une stabilisation et une activation du tumeur suppresseur p53 dans plusieurs cancers présentant une forme sauvage de p53 (Coll-Mulet et al., 2006).

Afin de déterminer si la Nutlin est efficace dans les cellules de mélanomes, nous traitons la lignée A375 avec la Nutlin-3 de 0 à 24h. Nous avons pu remarquer une augmentation du niveau protéique de p53 au cours du temps dans les cellules de mélanomes. En effet après 2h de traitement, nous sommes capables de détecter une accumulation de la protéine endogène p53 (Figure 18B). Cette observation nous permet de conclure que la régulation de p53 dans les cellules de mélanomes est dépendante de MDM2. De plus, lorsque l'on traite les cellules A375 avec un inhibiteur du protéasome le MG132, nous observons une accumulation de p53 endogène détectable à partir de 2h de traitement. Ainsi le niveau protéique de p53 est dépendant de la protéine MDM2 qui va induire sa dégradation via le protéasome (Figure 18A).



**Figure 18 La régulation de p53 dans les mélanomes est dépendante du protéasome et de MDM2**

Les cellules de mélanome A375 ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis traitées avec un inhibiteur du protéasome, le MG132 à 10 $\mu$ M. La protéine p53 a été détectée par western blot à la suite d'une cinétique de 4h (A). Les cellules de mélanome A375 ont été cultivées sans sérum pendant 12h puis traitées avec la nutlin-3 à 30 $\mu$ M lors d'une cinétique de 24h. L'abondance de la protéine p53 a été observée par western blot (B).

## Chapitre 5: DISCUSSION

La voie Ras/MAPK, activée par des facteurs de croissance, joue un rôle important dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire. Une précédente étude montre que des cellules transformées par l'oncogène Ras, ayant subies une exposition aux dommages à l'ADN, sont plus résistantes à l'apoptose, facteur dépendant de p53. Ceci est expliqué par le fait que Ras induit la transcription du gène MDM2 d'une manière indépendante de p53, ayant pour effet de favoriser la dégradation de p53 (Ries et al., 2000). La voie MAPK joue donc un rôle dans la régulation transcriptionnelle du gène de MDM2. Peu d'étude montre l'impact de la voie MAPK sur la régulation de MDM2, notamment au niveau post-transcriptionnel, nous avons donc dans ce rapport tenter de mieux comprendre la régulation de MDM2 et son impact sur le cancer.

### I. Caractérisation de la phosphorylation de MDM2 par la kinase RSK

Dans ce rapport, nous montrons que la voie MAPK induit la phosphorylation de l'ubiquitine ligase MDM2 sur la sérine 166 en utilisant un anticorps phospho-spécifique dirigé contre ce site de phosphorylation. Nos résultats montrent que le PMA et l'EGF, deux agonistes favorisant l'activation de la voie Ras/MAPK, induisent la phosphorylation de MDM2 en Ser166 plus efficacement que l'insuline qui active principalement la voie PI3K/Akt. L'ubiquitine ligase n'est donc pas uniquement régulée par la voie PI3K mais également par la voie MAPK de façon prédominante. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une dérégulation de la voie MAPK est rencontrée très tôt dans le développement des mélanomes par rapport à la voie PI3K. La voie MAPK va favoriser le développement tumoral en régulant par phosphorylation MDM2 et ainsi possiblement contrer les effets anti-prolifératifs de p53. Une précédente étude montre que MDM2 est phosphorylée en Ser166 par la voie MEK-ERK dans les hépatocytes (Malmlof et al., 2007). Nous avons montré que cette

phosphorylation était dépendante de l'activation de MEK1/2 et RSK. Nous avons pu moduler la phosphorylation de MDM2 en Ser166 à l'aide de différents inhibiteurs spécifiquement dirigés contre des acteurs de la voie MAPK. La voie MAPK cible donc les mêmes sites de phosphorylation que la kinase AKT. En effet, l'analyse de la séquence en acides aminés, nous a permis de mettre en évidence que les sérines 166 et 186 possèdent un motif de type (RXRXXS/T). Ce motif est associé au consensus de phosphorylation spécifique des kinases de la famille AGC dont fait partie RSK. Afin de vérifier l'hypothèse que MDM2 est une cible directe de RSK, nous avons effectué un essai kinase *in vitro*. Nous avons démontré que la kinase RSK phosphoryle MDM2 sur les Ser166 et 186 de manière directe et spécifique. Nous envisageons donc que les kinases RSK et AKT vont phosphoryler MDM2 afin de réguler son activité lors de différentes étapes de la progression tumorale. Nous pouvons également supposer que l'ensemble de la famille des kinases RSK (RSK1, RSK2, RSK3 et RSK4) phosphoryle MDM2 en Ser166 car ces kinases partagent la même séquence consensus de phosphorylation. Cependant, les kinases RSK sont exprimées de façons tissus dépendantes, MDM2 sera ainsi particulièrement régulée par les kinases RSK1, RSK2 qui sont majoritairement exprimées dans la plupart des cancers. Il serait intéressant de savoir si d'autres kinases, faisant partie de la famille des AGC, peuvent phosphoryler MDM2 sur ce même site comme S6 ou encore SGK. Ceci nous permettrait de mieux caractériser l'ensemble des acteurs pouvant réguler MDM2 et ainsi développer une thérapie ciblée envers ces kinases pour différents cancers.

Après avoir caractérisé la phosphorylation de MDM2 par la voie MAPK et plus spécifiquement par RSK, nous avons entrepris de comprendre le rôle biologique de cette phosphorylation sur MDM2.

## II. Caractérisation du rôle fonctionnel de la phosphorylation de MDM2 par RSK

La kinase AKT a été montrée pour induire la phosphorylation de MDM2 favorisant ainsi la stabilité de la protéine et la localisation cellulaire de cette dernière. Cependant, l'impact des sites de phosphorylation régulés par AKT sur le rôle biologique de MDM2 reste encore très controversé. Ceci peut s'expliquer par le fait que la voie MAPK phosphoryle de façon plus efficace les mêmes sites de phosphorylation ciblés par AKT. De plus, la plupart des études inhibent l'activité kinase ou la protéine AKT seule, ainsi l'influence de la voie MAPK doit rendre difficile l'étude des rôles biologiques dépendant des sites de phosphorylation.

Nous avons donc entrepris, dans un premier temps, de déterminer si les sites de phosphorylation influencent la capacité de MDM2 à s'auto-ubiquitiner. Pour cela, nous avons muté les différents sites de phosphorylations (Ser166 et 186) afin d'observer un effet indépendant des kinases qui jouent un rôle sur la régulation de ces sites. Nous avons pu démontrer une augmentation de l'ubiquitination basale du mutant MDM2 S2A (forme non phosphorylable) en comparaison avec le MDM2 WT. Par la suite, nous avons traité les cellules avec du MG132 (inhibiteur du protéasome) afin d'augmenter le niveau de protéines totales ubiquitinées. Nous avons pu observer une diminution de l'ubiquitination du mutant MDM2 S2D (forme constitutivement phosphorylable) comparé au MDM2 WT et S2A. La régulation de la stabilité de MDM2 n'est pas uniquement contrôlée par son auto-ubiquitination, une précédente étude montre que l'histone acétyltransférase p300-CBP-associated factor (PCAF) joue un rôle important dans la stabilité de MDM2 en poly-ubiquitinant ce dernier. L'inhibition de PCAF permettrait d'accentuer l'effet des sites de phosphorylation sur le profil d'ubiquitination de MDM2. Enfin certains partenaires protéiques comme p300 ou p19<sup>ARF</sup> ont un impact sur la régulation de la stabilité de MDM2. Il serait donc intéressant d'observer l'impact de ces partenaires protéiques avec les sites de phosphorylation régulés par la voie MAPK sur l'ubiquitination de MDM2.



Afin d'observer la fonction biologique résultant de ces différents niveaux d'ubiquitination de MDM2, nous avons, dans un premier temps, montré que l'activité kinase RSK favorise l'enrichissement de la protéine MDM2 dans les cellules. Cette observation peut être d'origine transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle. Nous pouvons suggérer que cet enrichissement est dû à une augmentation de la stabilité de la protéine. Cependant, la faible augmentation du transcrit en présence de la forme sauvage de RSK ne nous permet pas de dire que la stabilité est le seul facteur aboutissant à cet enrichissement. La voie MAPK joue un rôle important dans la régulation de la traduction des protéines. Il serait intéressant de connaître si la traduction de la protéine MDM2 est régulée par la voie MAPK. Nous avons montré dans ce rapport que la kinase RSK régule la stabilité de MDM2. L'effet sur la stabilité de MDM2 reste encore très faible. Il serait important de connaître si l'inhibition de la kinase AKT permettrait d'accentuer l'effet observé. De plus, des expériences non présentées dans ce rapport, ne nous ont pas permis de conclure que la stabilité de la protéine est uniquement dépendante des sites de phosphorylation Ser166 et 186 de MDM2. Ceci peut être expliqué par deux hypothèses, premièrement dans cette expérience nous avons utilisé des cellules HEK293T, ces cellules présentent l'antigène T du virus SV40, ce dernier peut avoir un impact majeur sur les résultats de stabilité générés, il serait donc intéressant de valider ces observations dans un autre modèle cellulaire. Deuxième, nous pouvons émettre l'hypothèse que RSK peut réguler une autre protéine ayant un impact sur la stabilité de MDM2 ou qu'une ou plusieurs protéines pourraient influencer de façon prédominante la stabilité de MDM2.

### **III. Evaluation du rôle de RSK dans la réponse au dommage à l'ADN et la chimiorésistance des mélanomes**

Le mélanome est un cancer très agressif et montre de nombreuses résistances aux chimiothérapies conventionnelles. Des mutations activatrices de la voie MAPK se produisent très tôt dans le processus de progression tumorale du mélanome. Les mélanomes forment ainsi un bon modèle d'étude. Dans ce

rapport, nous avons montré que l'ubiquitine ligase MDM2 est constitutivement phosphorylée en Ser166 en présence des mutations oncogéniques de la voie MAPK et dans les mélanomes. En effet, les mutations oncogéniques de H-Ras (G12V), B-Raf (V600E) et MEK1 (DD) favorisent l'activité constitutive de MDM2. Dans des lignées cellulaires de mélanomes présentant des mutations activatrices au sein de la voie MAPK, nous avons montré une forte phosphorylation de MDM2 en Ser166. Les cellules de mélanomes montrent un niveau protéique de MDM2 plus élevé que les cellules normales de mélanocyte, cependant le gène est rarement amplifié dans les mélanomes. Il serait intéressant d'observer l'impact de la voie MAPK sur la stabilité de MDM2 endogène et sur d'éventuelles régulations transcriptionnelles ou traductionnelles. Les cellules de mélanomes ne sont pas ou moins affectées par les agents induisant des dommages à l'ADN tel que la dacarbazine (DTIC) ou la temozolomide (TMZ). Afin de mieux comprendre le rôle de RSK sur le niveau protéique de p53 lors d'un dommage à l'ADN, nous avons utilisé de la camptothécine ; un inhibiteur de la topoisomérase I créant des cassures double brins. Nous avons montré que l'inhibition de RSK suite à un dommage à l'ADN permet d'augmenter faiblement le niveau protéique de p53 dans les cellules de mélanomes. L'étude des effets de la voie MAPK sur MDM2 et p53 pourrait être effectuée avec des lignées de mélanomes ne présentant aucune altération dans la voie PI3K afin de mieux comprendre l'impact de MAPK dans le développement tumoral précoce. Il serait intéressant d'observer l'impact de l'inhibition de RSK sur les gènes cibles de p53. De plus, lors de prochaines expériences, nous pourrions observer l'impact de l'inhibition de la kinase RSK sur les rôles biologiques de p53 comme l'induction de la sénescence et de l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, nous pouvons suggérer que dans les cellules utilisées, l'inhibition de la voie MAPK et PI3K simultanément permettrait d'augmenter plus efficacement le niveau protéique de p53. Afin de déterminer si le niveau de p53 est régulé majoritairement par MDM2, nous avons utilisé la Nutlin-3, un inhibiteur d'interaction de MDM2 et p53. Nous avons pu observer un fort enrichissement de p53 en présence de cette molécule. En vue de découvrir une molécule permettant de diminuer la chimiorésistance des cellules cancéreuses à la suite

d'un dommage à l'ADN ; ciblé spécifiquement RSK et/ou AKT permettrait de diminuer la croissance tumorale.

Nous pouvons suggérer que le mécanisme de régulation de MDM2 par la voie MAPK joue un rôle important dans la régulation du niveau de p53 des cellules normales. En effet, à la suite d'un dommage à l'ADN, des études montrent une augmentation de l'activité de la voie MAPK (Persons et al., 1999; Wang et al., 2000). Nous pouvons supposer que l'activation de la voie MAPK va favoriser une augmentation de la stabilité de MDM2 afin de diminuer le niveau protéique de p53 et permettre de réguler son action. De plus, cette suggestion peut être défendue dans le cas du cycle cellulaire où la voie MAPK joue un rôle essentiel, en effet, cette dernière va favoriser la progression du cycle en régulant positivement MDM2 ayant pour but de diminuer le niveau de p53 (Wilkinson and Millar, 2000).

## Chapitre 6: CONCLUSION

Dans ce rapport, nous avons pu montrer que la kinase RSK phosphoryle directement l'ubiquitin ligase MDM2 en Ser166 et 186. De plus, la kinase RSK favorise une accumulation protéique de MDM2 dépendante de son activité kinase que nous expliquons par une augmentation de sa stabilité. Enfin nous avons montré que l'inhibition de la kinase RSK permet d'induire une augmentation du niveau protéique de p53 après un dommage à l'ADN, suggérant que la kinase RSK pourrait être une cible thérapeutique afin de contrer la résistance des mélanomes aux chimiothérapies conventionnelles.

Cette étude nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression des mélanomes et de mieux caractériser la fonction de RSK dans le développement de cette tumeur. La suite de ce projet mettra l'accent sur la nécessité thérapeutique d'inhiber RSK dans les mélanomes. En effet, en combinant des inhibiteurs de RSK avec des agents chimiothérapeutiques, nous devrions être en mesure de limiter la croissance du mélanome et les risques de chimiorésistance.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., *et al.* (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139, 366-379.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S.S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lubke, M., *et al.* (2012). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development* 139, 397-410.
- Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., and Philips, M.R. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 39-51.
- Anjum, R., and Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 747-758.
- Atallah, E., and Flaherty, L. (2005). Treatment of metastatic malignant melanoma. *Current treatment options in oncology* 6, 185-193.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 3635-3648.
- Balch, C.M., Sober, A.J., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., and Committee, A.M.S. (2003). The new melanoma staging system. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 22, 42-54.
- Berndsen, C.E., and Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature structural & molecular biology* 21, 301-307.
- Breslow, A. (1978). The surgical treatment of stage I cutaneous melanoma. *Cancer treatment reviews* 5, 195-198.
- Breslow, A. (1980). Prognosis in cutaneous melanoma: tumor thickness as a guide to treatment. *Pathology annual* 15, 1-22.
- Budhidarmo, R., Nakatani, Y., and Day, C.L. (2012). RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends in biochemical sciences* 37, 58-65.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 50-83.
- Chene, P. (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 3, 102-109.
- Cheung, M., Sharma, A., Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2008). Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer research* 68, 3429-3439.
- Clark, W.H., Jr., Evans, H.L., Everett, M.A., Farmer, E.R., Graham, J.H., Mihm, M.C., Jr., Rosai, J., Sagebiel, R.W., and Wick, M.R. (1991). Early melanoma. Histologic terms. *The American Journal of dermatopathology* 13, 579-582.

Coll-Mulet, L., Iglesias-Serret, D., Santidrian, A.F., Cosials, A.M., de Frias, M., Castano, E., Campas, C., Barragan, M., de Sevilla, A.F., Domingo, A., *et al.* (2006). MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 107, 4109-4114.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* 6, 184-192.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartledge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Rosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* 41, 544-552.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78, 399-434.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer cell* 15, 294-303.

Dickson, B., Sprenger, F., Morrison, D., and Hafen, E. (1992). Raf functions downstream of Ras1 in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 360, 600-603.

Dillon, R.L., and Muller, W.J. (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research* 70, 4260-4264.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews Cancer* 9, 550-562.

Eton, O., Legha, S.S., Moon, T.E., Buzaid, A.C., Papadopoulos, N.E., Plager, C., Burgess, A.M., Bedikian, A.Y., Ring, S., Dong, Q., *et al.* (1998). Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16, 1103-1111.

Fahraeus, R., and Olivares-Illana, V. (2014). MDM2's social network. *Oncogene* 33, 4365-4376.

Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *The Journal of biological chemistry* 275, 8945-8951.

Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D.P., Merlo, A., Hess, D., and Hemmings, B.A. (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 279, 35510-35517.

Fisher, T.L., and Blenis, J. (1996). Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Molecular and cellular biology* 16, 1212-1219.

Flaherty, K.T., and Fisher, D.E. (2011). New strategies in metastatic melanoma: oncogene-defined taxonomy leads to therapeutic advances. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4922-4928.

Fountain, J.W., Bale, S.J., Housman, D.E., and Dracopoli, N.C. (1990). Genetics of melanoma. *Cancer surveys* 9, 645-671.

Fremin, C., and Meloche, S. (2010). From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology* 3, 8.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005a). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European journal of cancer* 41, 28-44.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005b). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European journal of cancer* 41, 45-60.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005c). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer* 41, 2040-2059.

Gray-Schopfer, V.C., da Rocha Dias, S., and Marais, R. (2005). The role of B-RAF in melanoma. *Cancer metastasis reviews* 24, 165-183.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.

Grivicich, I., Mans, D.R., Peters, G.J., and Schwartzmann, G. (2001). Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 34, 1087-1103.

Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.

Grossman, S.R., Perez, M., Kung, A.L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.X., Kumar, S., Howley, P.M., and Livingston, D.M. (1998). p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Molecular cell* 2, 405-415.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature cell biology* 5, 461-466.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

Hay, T.J., and Meek, D.W. (2000). Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS letters* 478, 183-186.

Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P., and Rodriguez, M.S. (2009). Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO reports* 10, 1250-1258.

Hocker, T.L., Singh, M.K., and Tsao, H. (2008). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2575-2595.

Honda, R., and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO journal* 18, 22-27.

Honda, R., and Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19, 1473-1476.

Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5249.

Itahana, K., Mao, H., Jin, A., Itahana, Y., Clegg, H.V., Lindstrom, M.S., Bhat, K.P., Godfrey, V.L., Evan, G.I., and Zhang, Y. (2007). Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer cell* 12, 355-366.

Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.

Takehi, Y., Ozdemir, E., Habuchi, T., Yamabe, H., Hashimura, T., Katsura, Y., and Yoshida, O. (1998). Absence of p53 overexpression and favorable response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinomas. *Japanese journal of cancer research : Gann* 89, 214-220.

Kawai, H., Wiederschain, D., and Yuan, Z.M. (2003). Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Molecular and cellular biology* 23, 4939-4947.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 37, 937-953.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* 81, 203-229.

Koyanagi, K., O'Day, S.J., Boasberg, P., Atkins, M.B., Wang, H.J., Gonzalez, R., Lewis, K., Thompson, J.A., Anderson, C.M., Lutzky, J., *et al.* (2010). Serial monitoring of circulating tumor cells predicts outcome of induction biochemotherapy plus maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 2402-2408.

Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyrhonen, S., and Hemminki, K. (2003). BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 3362-3368.

Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948-953.

Lange, J.R., Palis, B.E., Chang, D.C., Soong, S.J., and Balch, C.M. (2007). Melanoma in children and teenagers: an analysis of patients from the National Cancer Data Base. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 1363-1368.

Lappin, M.B., Kimber, I., and Norval, M. (1996). The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Archives of dermatological research* 288, 109-121.

Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S., and Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12, 547-554.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.



Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., Yu, H., Xu, X., Kong, J., Lee, J.T., and Herlyn, M. (2010). Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *Journal of cell science* 123, 853-860.

Lindstrom, M.S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G., and Zhang, Y. (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Molecular and cellular biology* 27, 1056-1068.

Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P.J., Vavvas, D., Marshall, M., and Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383, 181-185.

Mahrle, G., and Orfanos, C.E. (1974). Merkel cells as human cutaneous neuroreceptor cells. Their presence in dermal neural corpuscles and in the external hair root sheath of human adult skin. *Archiv fur dermatologische Forschung* 251, 19-26.

Malmlof, M., Roudier, E., Hogberg, J., and Stenius, U. (2007). MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes. Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 2288-2296.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

Marks, M.S., and Seabra, M.C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 738-748.

Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO journal* 18, 2137-2148.

Mayo, L.D., Dixon, J.E., Durden, D.L., Tonks, N.K., and Donner, D.B. (2002). PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *The Journal of biological chemistry* 277, 5484-5489.

Meek, D.W., and Knippschild, U. (2003). Posttranslational modification of MDM2. *Molecular cancer research : MCR* 1, 1017-1026.

Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science* 125, 531-537.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.

Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr. (2006). Melanoma. *The New England journal of medicine* 355, 51-65.

Moll, U.M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* 1, 1001-1008.

Mollaaghababa, R., and Pavan, W.J. (2003). The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 22, 3024-3034.

Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-206.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977.

Niezgoda, A., Niezgoda, P., and Czajkowski, R. (2015). Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *BioMed research international* 2015, 851387.

Nishimura, E.K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., and Fisher, D.E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell stem cell* 6, 130-140.

Oba, J., Nakahara, T., Abe, T., Hagihara, A., Moroi, Y., and Furue, M. (2011). Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *Journal of dermatological science* 62, 116-123.

Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *The Journal of biological chemistry* 277, 21843-21850.

Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-860.

Onel, K., and Cordon-Cardo, C. (2004). MDM2 and prognosis. *Molecular cancer research : MCR* 2, 1-8.

Ong, S.H., Hadari, Y.R., Gotoh, N., Guy, G.R., Schlessinger, J., and Lax, I. (2001). Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6074-6079.

Patton, E.E., Widlund, H.R., Kutok, J.L., Kopani, K.R., Amatruda, J.F., Murphey, R.D., Berghmans, S., Mayhall, E.A., Traver, D., Fletcher, C.D., *et al.* (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current biology : CB* 15, 249-254.

Pearson, R.B., and Kemp, B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods in enzymology* 200, 62-81.

Persons, D.L., Yazlovitskaya, E.M., Cui, W., and Pelling, J.C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5, 1007-1014.

Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* 33, 19-20.

Polsky, D., Bastian, B.C., Hazan, C., Melzer, K., Pack, J., Houghton, A., Busam, K., Cordon-Cardo, C., and Osman, I. (2001). HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer research* 61, 7642-7646.

Poremba, C., Yandell, D.W., Metze, D., Kamanabrou, D., Bocker, W., and Dockhorn-Dworniczak, B. (1995). Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. *Oncology research* 7, 331-339.

Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., and Boehm, N. (2008). [Functional histology of dermis]. *Annales de dermatologie et de venerologie* 135, 1S5-20.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.

Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrancois, M., Sicheri, F., and Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 461, 542-545.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.

Ranaweera, R.S., and Yang, X. (2013). Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 288, 18939-18946.

Raposo, G., and Marks, M.S. (2002). The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic* 3, 237-248.

Rawles, M.E. (1947). Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiological zoology* 20, 248-266.

Rayburn, E., Zhang, R., He, J., and Wang, H. (2005). MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets* 5, 27-41.

Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., McMahon, M., Oren, M., and McCormick, F. (2000). Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* 103, 321-330.

Riker, A.I., Radfar, S., Liu, S., Wang, Y., and Khong, H.T. (2007). Immunotherapy of melanoma: a critical review of current concepts and future strategies. *Expert opinion on biological therapy* 7, 345-358.

Romeo, Y., Zhang, X., and Roux, P.P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *The Biochemical journal* 441, 553-569.

Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13489-13494.

Sachs, A.B., and Varani, G. (2000). Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *nature structural biology* 7, 356-361.

Sakaizawa, K., Goto, Y., Kuniwa, Y., Uchiyama, A., Harada, K., Shimada, S., Saida, T., Ferrone, S., Takata, M., Uhara, H., *et al.* (2012). Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *British journal of cancer* 106, 939-946.

Satyamoorthy, K., Li, G., Guerrero, M.R., Brose, M.S., Volpe, P., Weber, B.L., Van Belle, P., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer research* 63, 756-759.

Sauter, E.R., Yeo, U.C., von Stemm, A., Zhu, W., Litwin, S., Tichansky, D.S., Pistritto, G., Nesbit, M., Pinkel, D., Herlyn, M., *et al.* (2002). Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer research* 62, 3200-3206.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.

Shao, Y., and Aplin, A.E. (2010). Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer research* 70, 6670-6681.

Sharma, A., Trivedi, N.R., Zimmerman, M.A., Tuveson, D.A., Smith, C.D., and Robertson, G.P. (2005). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer research* 65, 2412-2421.

Sharpless, N.E., Kannan, K., Xu, J., Bosenberg, M.W., and Chin, L. (2003). Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* 22, 5055-5059.

Sharpless, N.E., Ramsey, M.R., Balasubramanian, P., Castrillon, D.H., and DePinho, R.A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.

Sigismund, S., Polo, S., and Di Fiore, P.P. (2004). Signaling through monoubiquitination. *Current topics in microbiology and immunology* 286, 149-185.

Smack, D.P., Korge, B.P., and James, W.D. (1994). Keratin and keratinization. *Journal of the American Academy of Dermatology* 30, 85-102.

Smalley, K.S., and Herlyn, M. (2009). Integrating tumor-initiating cells into the paradigm for melanoma targeted therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124, 1245-1250.

Soengas, M.S., and Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138-3151.

Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* 64, 7002-7010.

Takashima, A., and Faller, D.V. (2013). Targeting the RAS oncogene. *Expert opinion on therapeutic targets* 17, 507-531.

Tao, W., and Levine, A.J. (1999a). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3077-3080.

Tao, W., and Levine, A.J. (1999b). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6937-6941.

Tarhini, A.A., and Agarwala, S.S. (2006). Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatologic therapy* 19, 19-25.

Teillet, M.A., and Le Douarin, N. (1970). [The migration of pigmentary cells studies by the method of heterospecific grafts of neural tube in bird embryo]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences Serie D: Sciences naturelles* 270, 3095-3098.

Teraï, K., and Matsuda, M. (2005). Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO reports* 6, 251-255.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 131-142.

Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365, 687-701.

Tovar, C., Rosinski, J., Filipovic, Z., Higgins, B., Kolinsky, K., Hilton, H., Zhao, X., Vu, B.T., Qing, W., Packman, K., *et al.* (2006). Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant

p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1888-1893.

Udell, C.M., Rajakulendran, T., Sicheri, F., and Therrien, M. (2011). Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 553-565.

Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *The Journal of biological chemistry* 271, 23512-23519.

van der Rest, M., and Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2814-2823.

van Elsas, A., Zerp, S., van der Flier, S., Kruse-Wolters, M., Vacca, A., Ruiter, D.J., and Schrier, P. (1995). Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 139, 57-67.

Vassilev, L.T. (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3, 419-421.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature reviews Cancer* 10, 842-857.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., *et al.* (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell* 18, 683-695.

Wade, M., Li, Y.C., and Wahl, G.M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 13, 83-96.

Wang, X., Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 275, 39435-39443.

Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature cell biology* 1, 20-26.

Wenzel, D.M., and Klevit, R.E. (2012). Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC biology* 10, 24.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* 79, 143-180.

Wilkinson, M.G., and Millar, J.B. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14, 2147-2157.

Wright, L.P., and Philips, M.R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research* 47, 883-891.

Wu, L., and Levine, A.J. (1997). Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol Med* 3, 441-451.

Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development* 7, 1126-1132.

You, M.J., Castrillon, D.H., Bastian, B.C., O'Hagan, R.C., Bosenberg, M.W., Parsons, R., Chin, L., and DePinho, R.A. (2002). Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1455-1460.

Yu, Z.K., Geyer, R.K., and Maki, C.G. (2000). MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. *Oncogene* 19, 5892-5897.

Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725-734.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* 3, 973-982.

Zhuang, L., Lee, C.S., Scolyer, R.A., McCarthy, S.W., Palmer, A.A., Zhang, X.D., Thompson, J.F., Bron, L.P., and Hersey, P. (2005). Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma. *Journal of clinical pathology* 58, 1163-1169.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001883.